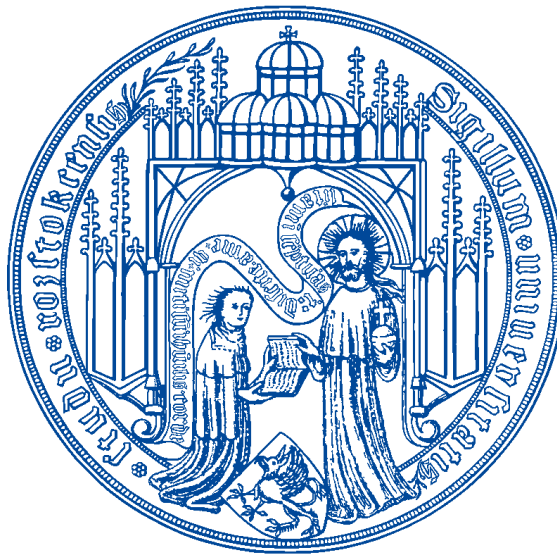


Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der  
Universitätsmedizin Rostock  
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J. C. Virchow

**Untersuchungen zu  
immunregulatorischen Mechanismen bei Probanden mit  
allergischem Asthma bronchiale**



**Inauguraldissertation**  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
Claudius Matt, geb. am 21.01.1989 in Gengenbach  
aus Rostock

Rostock, 2020

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Johann Christian Virchow, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abteilung für Pneumologie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Tiedge, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Armin Braun, Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin Hannover

Datum der Einreichung: 21.02.2020

Datum der Verteidigung: 26.01.2021

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Asthma bronchiale	1
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Formen des Asthma bronchiale	2
1.1.3 Pathophysiologie des Asthma bronchiale	3
1.2 Dendritische Zellen	4
1.2.1 Dendritische Zellen und deren Bedeutung bei Asthma bronchiale	6
1.3 T-Zell-kostimulatorische und T-Zell-koinhibitorische Moleküle antigenpräsentierender Zellen	7
1.4 T-Zellen	10
1.4.1 Regulatorische T-Zellen	11
1.5 Regulatorische B-Zellen	13
1.6 Zielsetzung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Studiendesign	15
2.1.1 Rekrutierung von Probanden	15
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	15
2.2 Gewinnung der Blutproben	17
2.3 Gesamt-IgE-Konzentration und spezifische IgE-Antikörper	17
2.4 Spirometrie	18
2.5 Isolierung, Differenzierung und Kultivierung von Zellen	19
2.5.1 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	19
2.5.2 Zellzählung und Einstellung der Zellzahl	21
2.5.3 Zellkultur	22
2.6 Durchflusszytometrie	23
2.6.1 Geräte und Materialien	23

Inhaltsverzeichnis	II
2.6.2 Methode	25
2.6.3 Durchführung	27
2.6.3.1 Markierung von Oberflächenantigenen auf Vollblutleukozyten	27
2.6.3.2 Markierung von intrazellulären Antigenen in Vollblutleukozyten	28
2.6.3.3 Markierung von intrazellulären Antigenen in isolierten PBMCs	28
2.6.3.4 Markierung von intrazellulären Antigenen in isolierten PBMCs nach Stimulation mit PMA und Ionomycin	29
2.6.3.5 Bestimmung der absoluten Zellzahl von Leukozyten, B-Zellen und T-Helferzellen im Vollblut	30
2.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	31
2.8 Statistische Auswertung	34
3 Resultate	35
3.1 Identifikation unterschiedlicher Zellpopulationen im peripheren Vollblut von Probanden mit Asthma und Normalpersonen	35
3.1.1 Identifikation von Leukozyten, B-Zellen, T-Helferzellen, mDCs und pDCs	35
3.1.2 Identifikation regulatorischer B-Zellen	38
3.1.3 Identifikation regulatorischer T-Zellen	39
3.2 Zytokinexpression in T-Helferzellen	42
3.3 Zytokinexpression in regulatorischen T-Zellen	45
3.4 Expression von Oberflächenmolekülen auf mDCs	46
3.5 Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen auf bzw. in pDCs	47
3.6 Lösliches PD-L1, PD-L2 und PD-1 im Serum	50
3.7 Korrelationen zwischen der Anzahl regulatorischer B-Zellen und der Zytokinexpression von T-Helferzellen im peripheren Vollblut	50
3.8 Korrelationen zwischen der Anzahl regulatorischer B-Zellen im peripheren Vollblut und der FEV <sub>1</sub> von Probanden mit Asthma	52

3.9	Korrelationen zwischen der PD-L1 Expression auf dendritischen Zellen und dem prozentualen Anteil von aTregs an den T-Helferzellen.....	52
4	Diskussion.....	54
4.1	T <sub>H</sub> 2-Zytokine werden bei Probanden mit Asthma signifikant häufiger exprimiert als bei Normalpersonen.....	54
4.2	CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> regulatorische B-Zellen haben möglicherweise einen protektiven Effekt bei Probanden mit leichtem Asthma bronchiale.....	56
4.3	Bei Probanden mit Asthma scheint im Vergleich zu Normalpersonen ein signifikant größerer Anteil der T-Helferzellen zu dem Treg-Subtyp „non-Tregs“ differenziert zu sein.....	58
4.4	Die CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> Treg-Population von Probanden mit allergischem Asthma bronchiale ist durch ein erniedrigtes T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 17-Potential charakterisiert.....	61
4.5	Die Anzahl von mDCs und pDCs im peripheren Blut von Probanden mit Asthma variiert und ist von der Allergenexposition abhängig.....	62
4.6	Die Expression der T-Zell-kostimulatorischen bzw. T-Zell-koinhibitorischen Moleküle CD86, ICOS-L und PD-L1 auf mDCs und pDCs des peripheren Blutes ist bei Normalpersonen und Probanden mit Asthma ähnlich.....	62
4.7	Die Granzym B-Expression in pDCs des peripheren Blutes ist bei Normalpersonen und Probanden mit Asthma ähnlich.....	64
4.8	PD-L1 ist möglicherweise an der Generierung von aTregs bei Probanden mit allergischem Asthma beteiligt.....	64
5	Zusammenfassung.....	66
6	Literaturverzeichnis.....	68
7	Anhang.....	88
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	88
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	90
7.3	Tabellenverzeichnis.....	92

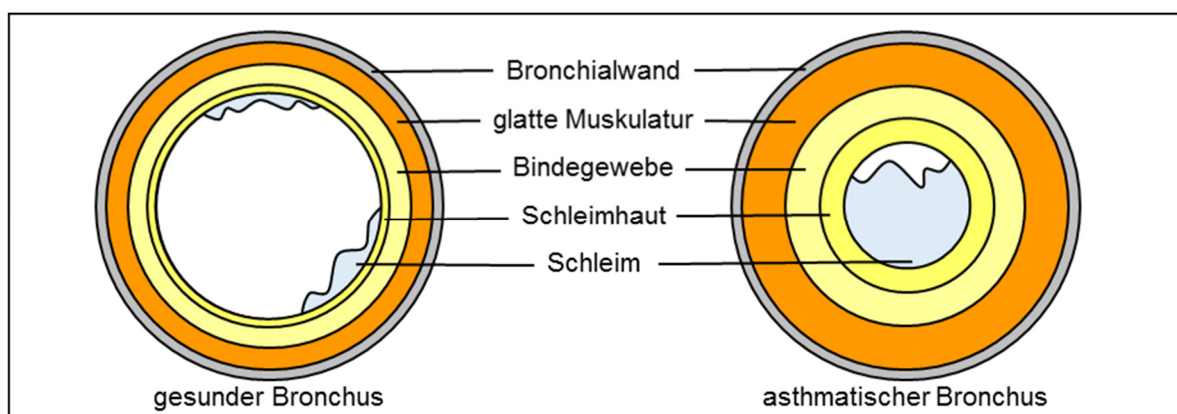
Inhaltsverzeichnis	IV
7.4 Curriculum vitae	93
7.5 Danksagung	94
7.6 Persönliche Erklärung	95
8 Thesen zur Dissertation	96

## 1 Einleitung

### 1.1 Asthma bronchiale

Der Begriff „Asthma“, vom griechischen „asthmatai“, bedeutet Atemnot und hat seinen Ursprung im Altertum, wo er von Homer in der „Ilias“ (8. Jahrhundert v. Chr.) verwendet wurde um das Keuchen und Schnaufen der Helden im Kampf um Troja zu beschreiben. Die Definition des Asthmas unterlag seither, je nach gültiger pathophysiologischer Konzeption, einer ständigen Modifikation (Matthys & Seeger 2008; Reuter 2004). So ging man bis weit ins 20. Jahrhundert davon aus, dass Asthma bronchiale eine Erkrankung der Bronchialmuskulatur wäre und durch neurogene Einflüsse auf die Muskulatur der Atemwege entstehe. Erst in den letzten Jahrzehnten setzte sich die Erkenntnis durch, dass dem Asthma eine anhaltende Entzündung der Atemwege mit teils irreversiblen Umbauprozessen, dem „Airway-Remodeling“, zugrunde liegt (Reuter 2004).

Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft wird Asthma als eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch bronchiale Hyperreagibilität und variable Atemwegsobstruktion, definiert (Deutsche Atemwegsliga 2006; Global Initiative for Asthma 2018). Typischerweise kommt es vor allem nachts oder am frühen Morgen zu rezidivierenden Episoden von plötzlich auftretender Luftnot, häufig in Kombination mit Husten, einem thorakalen Engegefühl und einem pfeifenden Atemgeräusch (Mutschler et al. 2013). Die bronchiale Obstruktion wird durch Kontraktion der glatten Muskulatur der Bronchialwände, Hypersekretion der schleimproduzierenden Zellen des Bronchialepithels, Schleimhautschwellung und irreversible Umbauvorgänge verursacht (Ukena et al. 2008, Abb. 1-1).



**Abb. 1-1: Querschnitt durch einen gesunden und einen asthmatischen Bronchus.**

Im Gegensatz zum gesunden Bronchus ist beim asthmatischen Bronchus die glatte Muskulatur kontrahiert, das Bindegewebe entzündet und die Schleimhaut stark angeschwollen. Zusätzlich wird vermehrt Schleim produziert.

### **1.1.1 Epidemiologie**

Nach dem Global Asthma Report 2018 leiden derzeit weltweit 339 Millionen Menschen unter Asthma bronchiale (Global Asthma Network 2018). Damit gehört Asthma zu den häufigsten Krankheiten überhaupt. Die Erkrankung findet sich prinzipiell in jedem Lebensalter, tritt aber in den meisten Fällen als chronische Krankheit im Kindes- und Jugendalter auf (Gibson et al. 2013; World Health Organization 2013). In der Bundesrepublik Deutschland leiden etwa fünf Prozent der Erwachsenen und bis zu zehn Prozent der kindlichen Bevölkerung an Asthma bronchiale (Stock et al. 2005). Neben den gesundheitlichen Einschränkungen des Individuums stellt Asthma bronchiale auch eine erhebliche ökonomische Belastung für die Gesellschaft dar (Kirsch et al. 2013).

### **1.1.2 Formen des Asthma bronchiale**

Abhängig von einer nachweisbaren allergischen Diathese kann grundsätzlich zwischen allergischem (extrinsischem) und nicht-allergischem (intrinsischem) Asthma unterschieden werden (Buhl et al. 2006). Das allergische Asthma bronchiale kommt mit einem Anteil von 90% aller Erkrankungen wesentlich häufiger vor als das nicht-allergische Asthma bronchiale (Matthys & Seeger 2008).

Der Asthmatiker bildet beim allergischen Asthma bronchiale spezifische IgE-Antikörper gegen Umweltallergene wie beispielsweise Pollen, Tierproteine oder Schimmelpilzsporen, welche typischerweise zusammen mit einer Erhöhung des Gesamt-IgEs und der Eosinophilenzahl im Blut nachweisbar sind (Kroegel & Costabel 2014; Virchow 1996). Je nach auslösendem Allergen kann eine jahreszeitliche Varianz der Symptomatik bestehen. Weiterhin ist das allergische Asthma häufig mit anderen atopischen Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis und der allergischen Rhinokonjunktivitis assoziiert und in der Familie des Erkrankten besteht meist eine allergische Diathese (Virchow 1996). Diese Form des Asthmas kann sich prinzipiell in jedem Alter manifestieren, vor allem aber in der Kindheit und Adoleszenz.

Das nicht-allergische Asthma bronchiale dagegen, manifestiert sich in der Regel erst im mittleren Erwachsenenalter (>40 Jahre), häufig in Verbindung mit einem respiratorischen Infekt (Matthys & Seeger 2008). Eine allergische Diathese oder Vermehrung des Gesamt- bzw. spezifischen IgEs fehlt hier, da keine Sensibilisierung gegenüber exogenen Faktoren vorliegt. Allerdings ist häufig eine stärker ausgeprägte Eosinophilie als beim allergischen Asthma bronchiale zu beobachten (Kroegel & Costabel 2014; Virchow 1996). Charakteristisch ist auch die Persistenz der Symptomatik ohne größere saisonale Varianz. Die beiden Asthmatypen, allergisches und nicht-allergisches Asthma bronchiale, treten oft auch als Mischformen auf (Buhl et al. 2006).



Andere Termini wie beispielsweise das nokturnale-, das anstrengungs-induzierte-, das Analgetika-assoziierte- oder das Husten-Asthma (Cough Variant-Asthma), beziehen sich nicht auf eigenständige Formen eines Asthmas. Vielmehr heben die Bezeichnungen entweder ein im Vordergrund stehendes Symptom, einen Auslöser oder eine tageszeitliche Betonung asthmatischer Beschwerden eines zugrunde liegenden allergischen oder intrinsischen Asthmas oder aber eine Mischform aus beiden Varianten, hervor (Buhl et al. 2006).

### **1.1.3 Pathophysiologie des Asthma bronchiale**

Beim allergischen Asthma bronchiale bilden insbesondere dendritische Zellen, welche in der Mukosa der Atemwege ansässig sind, den Ausgangspunkt der Atemwegsentszündung. Diese Zellen wirken als antigenpräsentierende Zellen (APC) indem sie Allergene internalisieren, ihnen ein Peptidsegment abspalten und sie über MHC-II-Rezeptoren in den drainierenden Lymphknoten an spezifische T-Zell-Rezeptoren (TCR) von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (T-Helferzellen) präsentieren (Lambrecht 2001; McWilliam et al. 1995). Die so aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sezernieren Interleukin-2 (IL-2), welches autokrin über IL-2-Rezeptoren zu einer ausgeprägten Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen führt (Mutschler et al. 2013). Unter dem Einfluss von IL-4 differenzieren und proliferieren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu Typ2-T-Helferzellen (klonale Expansion), die mittels IL-13 B-Zellen zur IgE-Antikörperproduktion stimulieren (Lambrecht & Hammad 2003). Der Großteil der gebildeten antigenspezifischen IgE-Antikörper bindet an hoch affine IgE-Rezeptoren (FcεRI) an der Oberfläche von Mastzellen und initiiert deren Sensibilisierung. Werden bei erneutem Allergenkontakt zwei benachbarte IgE-Antikörper durch das Allergen überbrückt, so tritt infolge einer Degranulation dieser Zellen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Prostaglandinen, Leukotrienen und Plättchenaktivierender Faktor (PAF) ein. Diese freigesetzten Entzündungsmediatoren führen zur Entzündung der Atemwege und über Bronchokonstriktion, Dyskrinie (Hypersekretion eines zähen Schleims) und Ödembildung innerhalb kürzester Zeit zur Atemwegsobstruktion (Dullaers et al. 2012; Finotto et al. 2000). Durch Abbau dieser Mediatoren bildet sich die Bronchialverengung im Verlauf von ein bis zwei Stunden spontan zurück. Der beschriebene Pathomechanismus gilt als wichtigster Auslöser der allergischen Sofortreaktion beim Asthma bronchiale (Virchow 1996).

Bei der asthmatischen Spätreaktion mit erneuter Atemwegsverengung 6-12 Stunden nach Allergenkontakt und bei der chronischen Entzündung der Atemwege spielen vor allem eosinophile Granulozyten, welche durch die Freisetzung von IL-5 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) durch Typ2-T-Helferzellen chemotaktisch in das Lungengewebe gelockt werden, eine Rolle (Kroegel & Costabel 2014). Neben bronchokonstriktorisch wirkenden Mediatoren, sezernieren die eosinophilen

Granulozyten eine Reihe basischer Proteine (major basic protein, MBP; eosinophil cationic protein, ECP; eosinophil derived neurotoxin, EDN) sowie Sauerstoffmetabolite ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ), die eine Zerstörung des Bronchialepithels induzieren (Finotto et al. 2000; Kroegel & Costabel 2014). Verschiedene Untersuchungen stellen allerdings in Frage ob eosinophile Granulozyten tatsächlich an einer im Rahmen der asthmatischen Spätreaktion stattfindenden erneuten Bronchokonstriktion beteiligt sind. So wurde beispielsweise durch die Applikation von IL-5 Antikörpern (Mepolizumab), die Eosinophilenzahl im Blut und Sputum von Probanden reduziert ohne dass sich dabei eine Abschwächung der Spätphasen-Bronchokonstriktion zeigte (Leckie et al. 2000). Bei einer anderen Studie zeigten sich die eosinophilen Granulozyten erst 42 Stunden nach segmentaler Allergenprovokation in maximaler Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL), also deutlich nach dem Auftreten einer klinischen Spätreaktion (Lommatzsch et al. 2006). Eosinophile Granulozyten sind bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale zwar vermehrt in den Atemwegen vorhanden und ihre Anzahl im peripheren Blut und im Lungengewebe korreliert mit dem Schweregrad der Entzündung, jedoch ist es fraglich, ob sie an einer Spätphasen-Bronchokonstriktion beteiligt sind. Einige Studien lassen sogar vermuten, dass sie einen protektiven Effekt auf die Verengung der Atemwege haben (Kobayashi et al. 2003).

Wie beim allergischen Asthma bronchiale wird auch beim nicht-allergischen Asthma bronchiale in erster Linie eine Degranulation von Mastzellen als Auslöser eines akuten Asthmaanfalls verantwortlich gemacht (Anderson 2010). Unterschiede bestehen aber darin, dass beim nicht-allergischen Asthma bronchiale die Freisetzung der bronchokonstriktorischen Mediatoren nicht durch spezifische Antikörper vermittelt wird und auch die asthmatische Spätreaktion ausbleibt. Der genaue Pathomechanismus, der beim nicht-allergischen Asthma bronchiale zur Mastzelldegranulation führt, ist bis heute nicht im Detail bekannt.

## 1.2 Dendritische Zellen

Bereits 1868 entdeckte Paul Langerhans dendritische Zellen in der Basalschicht der Epidermis, ordnete sie aber fälschlicherweise aufgrund ihrer Morphologie den Neuronen zu (Romani et al. 2003). Heute geht man davon aus, dass dendritische Zellen als professionelle APC, das entscheidende Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort darstellen.

Man unterscheidet zwei Hauptgruppen der dendritischen Zellen, die myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) und die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs). Beide Gruppen entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen, schlagen jedoch unterschiedliche Entwicklungswege ein. So entwickeln sich die myeloiden

dendritischen Zellen in der myeloiden Zellreihe wohingegen sich die plasmazytoiden dendritischen Zellen in der lymphatischen Zellreihe entwickeln (Rink et al. 2015). Nach ihrer Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren mDCs und pDCs in einer unreifen bzw. nichtaktivierten Form (precursor-DC) im Blutstrom. Sie gelangen durch Chemotaxis in die peripheren Gewebe und werden durch Interaktion ihrer Chemokinrezeptoren mit den vor Ort produzierten Chemokinen im Gewebe festgehalten. Beispielsweise exprimieren unreife DCs die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR1 was ihnen über die entsprechenden Liganden eine Migration in entzündlich verändertes Gewebe, wie gegebenenfalls die Lunge eines Asthmatikers, ermöglicht (Sallusto et al. 1998). Jedoch auch in einer nicht entzündlich veränderte Lunge wandern DCs in geringerer Anzahl unter steady-state Bedingungen in das Gewebe ein (Holt et al. 1994). In der Lunge kommen dendritische Zellen im Lungenparenchym, im Bronchialepithel und in der viszerale Pleura vor (Sertl 1986). Pulmonale DCs können mittels einer Bronchialbiopsie, einer BAL oder durch induziertes Sputum identifiziert und charakterisiert werden (Upham & Xi 2016).

Da unreife DCs der peripheren Gewebe auf ihrer Oberfläche nur wenige MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle und nur wenige kostimulatorische Moleküle tragen, können sie hier keine naiven T-Zellen aktivieren (Banchereau & Steinman 1998). Erst durch die Interaktion mit einem Pathogen kommt es zur Aktivierung und Ausreifung der dendritischen Zellen. Hierbei werden Mikroorganismen bzw. Antigene aus der extrazellulären Flüssigkeit aufgenommen und im Cytoplasma zu Antigenfragmenten verarbeitet (Prozessierung). Durch die Herabregulation gewebespezifischer Chemokinrezeptoren aber insbesondere durch die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 hat die reife dendritische Zelle die Fähigkeit, aus dem infizierten bzw. entzündlichen Gewebe entlang eines Gradienten der CCR7-Liganden, CCL19 und CCL21, in die regionären Lymphknoten auszuwandern. CCL19 und CCL21 werden von Endothelzellen der Lymphkapillaren, von Stromazellen und reifen DCs der Lymphorgane produziert (Forster et al. 2008; Seth et al. 2011). Angekommen in den regionären Lymphknoten werden die Pathogenbestandteile über MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Moleküle der dendritischen Zellen an CD8<sup>+</sup>-zytotoxische-T-Zellen bzw. CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen präsentiert (Rink et al. 2015). Zur Aktivierung der T-Zellen bzw. zur Induktion der primären Immunantwort ist außerdem die verstärkte Expression costimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80, CD83, CD86 und OX40L durch die reifen dendritischen Zellen nötig. So können CD80 und CD86 beispielsweise an CD28 der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen binden und fördern damit die Umwandlung der CD4<sup>+</sup>-T-Helferzelle in eine Effektorzelle (Ueno et al. 2007, 2.2.2).

Während CD8<sup>+</sup>-T-Zellen einen einheitlichen zytotoxischen Phänotyp entwickeln, können sich CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen in mehrere verschiedene Typen von Effektoruntergruppen, die sich auf andere Zellen in unterschiedlicher Weise auswirken,

differenzieren. Bis jetzt ist bekannt, dass sich naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in mindestens vier Effektorsubtypen differenzieren: Typ1-, Typ2 und Typ17-T-Helferzellen, sowie die regulatorischen T-Zellen. Welche T-Zell-Antwort initiiert wird hängt einerseits vom Typ und vom Aktivierungsgrad der dendritischen Zellen (Pulendran et al. 1999) und andererseits von der Art und der Menge des präsentierten Antigens, sowie von begleitenden Umweltfaktoren ab (Vieira et al. 2000).

Im Gegensatz zu den mDCs weisen die pDCs eine geringere Expression von MHC-Molekülen und costimulatorischen Molekülen auf, wodurch sie eine geringere Aktivität hinsichtlich ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen zeigen. Ihre Aufgabe besteht vielmehr in der Freisetzung großer Mengen von Interferon- $\alpha$ , besonders als Antwort auf Virusinfektionen (Lund et al. 2003). Dabei spielen die von ihnen intrazellulär exprimierten Toll-like-Rezeptoren, TLR-7 und TLR-9, die Bestandteile von Mikroorganismen erkennen, eine wesentliche Rolle (Lund et al. 2004; Kadowaki et al. 2001; Jarrossay et al. 2001). PDCs können also einerseits eine angeborene antivirale Immunantwort zur Eindämmung der viralen Replikation initiieren, andererseits aber auch über ihre Ausreifung die erworbene Immunantwort starten (Kadowaki et al. 2000). Durch Sekretion der Serinprotease Granzym B sind pDCs außerdem in der Lage die T-Zellproliferation zu hemmen und somit eine immunsuppressive Wirkung zu entfalten (Jahrsdörfer et al. 2010; Bratke et al. 2010).

### **1.2.1 Dendritische Zellen und deren Bedeutung bei Asthma bronchiale**

Die Beteiligung von DCs an der Pathogenese des Asthma bronchiale wird durch viele wissenschaftliche Studien belegt. Schon seit längerem ist bekannt, dass DCs in der Bronchialschleimhaut von Patienten mit Asthma in erhöhter Anzahl vorkommen (Upham & Xi 2016). So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Patienten mit Asthma, die in Folge ihrer Erkrankung verstarben, eine höhere Dichte an DCs in ihren Bronchialwänden aufweisen, als Personen, die ohne an einer Lungenerkrankung zu leiden verstarben (Cagnoni et al. 2015).

Bei Personen mit allergischem Asthma bronchiale hat sich die inhalative Allergenprovokation als effektive Methode zur Untersuchung der Migration dendritischer Zellen erwiesen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an DCs im Sputum und der BAL bei Probanden mit Asthma nach inhalativer Allergenprovokation zunahm und im peripheren Blut abnahm. Hierfür wird die vermehrte Rekrutierung von DCs aus dem peripheren Blut in die Lunge nach inhalativem Allergenkontakt verantwortlich gemacht (Bratke et al. 2007; Dua et al. 2010; Dua et al. 2014; Upham et al. 2002). Weiterhin konnte eine erhöhte Anzahl an DCs im Knochenmark bzw. eine vermehrte Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in DCs nach inhalativer Allergenprovokation bei Probanden mit Asthma beobachtet werden (El-Gammal et al. 2016). Anhand eines Asthma-

Mausmodells wurde gezeigt, dass die DCs der Atemwege nicht nur für die Sensibilisierung auf inhalative Antigene, sondern auch für die Aufrechterhaltung der allergischen Inflammation mit eosinophilen Granulozyten entscheidend sind (Lambrecht 2005). Studien bei denen Patienten mit Asthma inhalative Glukokortikoide erhielten zeigten eine Korrelation zwischen der Abnahme der Anzahl von DCs in der Lunge und erhöhter klinischer Wirksamkeit des Medikamentes, was teilweise die Effektivität von Glukokortikoiden in der Asthmatherapie erklären könnte (Hoogsteden et al. 1999; Moller et al. 1996). Die besondere Bedeutung von pulmonalen DCs bei der Induktion der maladaptiven  $T_H2$ - und  $T_H17$ -Antwort bei allergischem Asthma konnte in unterschiedlichen Studienmodellen, sowohl an Mäusen als auch an Menschen, gezeigt werden (Hammad et al. 2009; Kuipers et al. 2009; van Rijt et al. 2005). Andere Studien weisen darauf hin, dass DCs durch Initiierung der Bildung regulatorischer T-Zellen auch die Fähigkeit besitzen eine periphere Immuntoleranz auszulösen (Enk 2005; Mahnke & Enk 2005).

### **1.3 T-Zell-kostimulatorische und T-Zell-koinhibitorische Moleküle antigenpräsentierender Zellen**

Lafferty et al. (1975) erkannten bereits im Jahr 1975, dass unter physiologischen Bedingungen für die vollständige Aktivierung einer naiven T-Zelle zwei Signale nötig sind: Das erste Signal wird durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC-Peptid-Komplex auf der Oberfläche einer spezialisierten APC vermittelt. Das zweite Signal wird simultan zum ersten Signal über die Interaktion von Oberflächenmolekülen der B7-Familie auf APCs mit korrespondierenden Rezeptoren aus der CD28-Familie auf der Oberfläche von T-Zellen initiiert. Je nach Ligand und Rezeptor kann hierbei ein T-Zell-kostimulatorisches oder -koinhibitorisches Signal ausgelöst werden, wodurch die Immunantwort entweder verstärkt oder abgeschwächt wird (Abb. 2-1). Bleibt das zweite Signal aus, wird die T-Zelle apoptotisch oder anerg, also unfähig auf das präsentierte Antigen zu reagieren (Bretscher 1999; Collins et al. 2005; Sharpe & Freeman 2002).

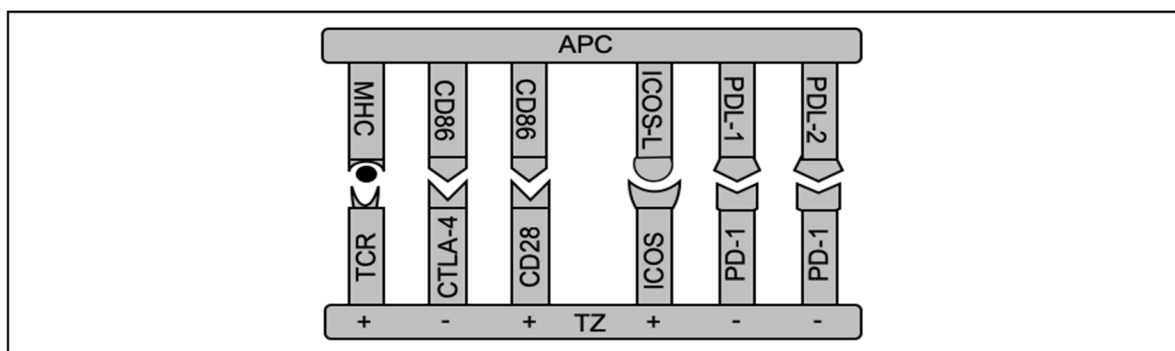
Die kostimulatorischen und koinhibitorischen Signale sollen sicherstellen, dass naive T-Zellen nur von professionellen APCs aktiviert werden können und nicht von anderen Zellen, die zufällig das Antigen auf ihrer Oberfläche tragen (Murphy et al. 2018). Zur B7-Familie zählen unter anderem die Liganden CD80, CD86, inducible costimulator ligand (ICOS-L), programmed death-ligand 1 (PD-L1) und programmed death-ligand 2 (PD-L2). Mitglieder der CD-28-Familie sind CD28, CTLA-4, ICOS und PD-1 (Collins et al. 2005; Lombardi et al. 2010). Jedes dieser Moleküle hat höchstwahrscheinlich einen besonderen Einfluss auf die Aktivierung, die Funktion und das Überleben von T-Zellen und kann somit auch involviert in die Entstehung einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen und Allergien sein (Lombardi et al. 2010).

Die Liganden CD80 und CD86 werden von spezialisierten APCs, wie etwa den dendritischen Zellen, exprimiert und können sowohl CD28 als auch CTLA-4 an der Oberfläche von naiven T-Zellen binden (Alegre et al. 2001; Coyle & Gutierrez-Ramos 2001; Sharpe & Freeman 2002). Der kostimulatorische Rezeptor CD28 verstärkt die Immunantwort und fördert die Differenzierung naiver T-Zellen in Effektorzellen (Rulifson et al. 1997). Dagegen schwächt der koinhibitorische Rezeptor CTLA-4 die Immunantwort ab bzw. fördert die Immuntoleranz der T-Zellen (Chambers 2001; Greenwald et al. 2005). Sowohl CD80 als auch CD86 können demzufolge entweder ein kostimulatorisches oder ein koinhibitorisches Signal in einer T-Zelle auslösen. Verschiedene Studien zeigten, dass die Überexpression von CD80 und CD86 durch APCs mit der Entstehung von allergischen Erkrankungen und Asthma korreliert (Lombardi et al. 2010). So zeigten beispielsweise Hofer et al. (1998), dass B-Lymphozyten von Probanden mit Asthma nach inhalativer Allergenprovokation vermehrt CD86, nicht jedoch CD80, exprimieren. Wohingegen bei Probanden mit Asthma ohne inhalative Allergenprovokation und bei einer gesunden Kontrollgruppe keine vermehrte Expression von CD86 auffiel. In einer anderen Studie konnte eine Überexpression von CD80, jedoch nicht von CD86, bei Alveolarmakrophagen von Atopikern beobachtet werden (Burastero et al. 1999).

Ein weiterer Ligand, der von APCs exprimiert wird, ist ICOS-L. Dieser bindet an den kostimulatorischen Rezeptor ICOS, der sich auf der Oberfläche von T-Zellen, insbesondere von Typ2-T-Helferzellen, befindet (McAdam et al. 2000). Es wird davon ausgegangen, dass die Kostimulation über den Rezeptor ICOS zwar die Zytokinsynthese und die Migration einer Typ2-T-Helferzelle beeinflusst, jedoch nicht die Differenzierung einer naiven T-Zelle zu einer Effektorzelle (McAdam et al. 2000; Tesciuba et al. 2008). Beispielsweise konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass durch ICOS-Blockade zwar die Zytokinsynthese von Typ2-T-Helferzellen, nicht aber die Differenzierung naiver T-Zellen in Typ2-T-Helferzellen gehemmt wurde (Tesciuba et al. 2001). CD28 und seine Liganden spielen also eher eine Rolle bei der Differenzierung einer naiven T-Zelle in eine Effektorzelle. ICOS und sein Ligand dagegen spielen eher eine Rolle bei der Regulation der Zytokinsynthese einer Effektorzelle. Trotzdem wird davon ausgegangen, dass sich die Funktionen beider Rezeptoren teilweise überschneiden bzw. sich sogar gegenseitig ergänzen (Sharpe & Freeman 2002).

Der koinhibitorische Rezeptor PD-1 wird auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen exprimiert und bindet zwei Liganden der B7-Familie: PD-L1 und PD-L2. PD-L1 wird auf einer Vielzahl von Zellen konstitutiv exprimiert, während die Expression von PD-L2 typischerweise bei einer Entzündung auf APCs induziert wird (Agata et al. 1996; Lombardi et al. 2010; Murphy et al. 2018). Die Annahme, dass PD-1 eine inhibitorische Wirkung auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort hat, wurde als erstes von Nishimura et al.

(1999) durch eine Studie, bei der PD-1-defiziente Mäuse eine Autoimmunität entwickelten, demonstriert. Anschließend wurde in mehreren Studien gezeigt, dass durch die Bindung von PD-L1 oder PD-L2 an PD-1 die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Proliferation und Zytokinexpression von aktivierten T-Zellen inhibiert wird (Freeman et al. 2000; Latchman et al. 2001). In einem Asthma-Mausmodell zeigte sich, dass PD-L2 auf pulmonalen DCs und Alveolarmakrophagen sensibilisierter Mäuse vermehrt exprimiert wird. Weiterhin wurde durch Blockade von PD-L2 mittels Anti-PD-L2-Antikörper eine Verstärkung der bronchialen Hyperreagibilität nach inhalativer Allergenprovokation sowie eine verstärkte Synthese von  $T_H2$ -Zytokinen beobachtet. Es wird angenommen, dass dieser Effekt durch IFN- $\gamma$  vermittelt wird, da bei IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen nach PD-L2-Blockade und inhalativer Allergenprovokation keine asthmatische Atemwegsreaktion und keine Überexpression von PD-L2 auf dendritischen Zellen beobachtet wurde (Matsumoto et al. 2008; Matsumoto et al. 2004). In einer anderen Studie konnte bei PD-L1-defizienten Mäusen eine signifikante Reduktion und bei PD-L2-defizienten Mäusen dagegen ein signifikanter Anstieg der bronchialen Hyperreagibilität bei inhalativer Allergenprovokation zuvor sensibilisierter Mäuse festgestellt werden. Außerdem konnte anhand von diesem Asthma-Mausmodell gezeigt werden, dass PD-L2-defiziente Mäuse eine stärkere pulmonale Entzündungsreaktion entwickeln als eine Kontrollgruppe bestehend aus Wildtyp-Mäusen (Akbari et al. 2010). Es wäre demnach auch vorstellbar, dass PD-L1 und PD-L2 gegensätzliche Rollen bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen und Asthma einnehmen; während PD-L1 potentiell bedeutend für die Entwicklung von bronchialer Hyperreagibilität ist, könnte der PD-1/PD-L2-Signalweg womöglich zu einer protektiven Immunantwort führen.



**Abb. 1-2: Schematische Darstellung der T-Zell-Kostimulation.**

Durch Interaktion von antigenpräsentierenden Zellen (APC) mit T-Zellen (TZ) modulieren verschiedene Moleküle die T-Zellaktivierung durch stimulatorische (+) und inhibitorische (-) Signale.

## 1.4 T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks und durchlaufen im Thymus unterschiedliche Reifungsstadien. Nach Abschluss ihrer thymischen Entwicklung können sie vereinfacht in CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen eingeteilt werden (Starr et al. 2003). T-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren (TCR), welche mit den Immunglobulinen verwandt sind und spezifisch Antigene auf APCs erkennen können. Wird ein Antigen von einer T-Zelle gebunden und erfolgt die notwendige Kostimulation so wird die T-Zelle aktiviert (Murphy et al. 2018).

CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen können mit ihrem TCR an MHC-Klasse-I-Moleküle, welche auf allen kernhaltigen Körperzellen vorkommen und zellinterne Antigene präsentieren, binden. Die wichtigste Funktion zytotoxischer T-Zellen ist die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen und virusinfizierter Zellen über die Freisetzung zytotoxischer Granula.

CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen dagegen erkennen extrazelluläre Antigene nach deren Prozessierung und anschließender Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle durch APCs. Sie können sich zu vier verschiedenen Subpopulationen mit bestimmten Effektoreigenschaften differenzieren: Typ1, Typ2 und Typ17-T-Helferzellen, sowie regulatorische T-Zellen (Rink et al. 2015). Typ1, Typ2 und Typ17-T-Helferzellen wurden nach den von ihnen, im Rahmen einer Immunantwort, sezernierten Zytokinen definiert und können anhand ihrer typischen Zytokinexpression durchflusszytometrisch identifiziert werden. Die unterschiedlichen Zytokinmuster dieser T-Helferzell-Subpopulationen aktivieren zur Bekämpfung von Pathogenen jeweils bestimmte Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Typ1-T-Helferzellen (T<sub>H</sub>1-Zellen) bilden hauptsächlich IFN- $\gamma$  und IL-2, deren Funktion in erster Linie die Aktivierung von Makrophagen am Inflamationsherd ist (Jäger & Kuchroo 2010). Dieser Zellpopulation wird beim allergischen Asthma bronchiale ein protektiver Effekt zugeschrieben (Hansen 2001). In dieser Arbeit wurden die Typ1-T-Helferzellen über ihre IFN- $\gamma$ -Expression durchflusszytometrisch identifiziert.

Typ2-T-Helferzellen (T<sub>H</sub>2-Zellen) exprimieren typischerweise die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Dieser Subpopulation der T-Helferzellen werden sehr unterschiedliche Funktionen beigemessen. So sind sie beispielsweise essentiell für die Beseitigung extrazellulärer Organismen und Parasiten (Jäger & Kuchroo 2010). Außerdem sollen sie eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale spielen (Shinoda et al. 2017). Die Typ2-T-Helferzellen wurden in dieser Arbeit über ihre IL-4, IL-5 und IL-13-Expression identifiziert.

Von den Typ17-T-Helferzellen (T<sub>H</sub>17-Zellen) wird überwiegend das Zytokin IL-17 sezerniert. Sie induzieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine



und sorgen dadurch für eine Aufrechterhaltung der Entzündung und für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten an den Inflammationsherd (Jäger & Kuchroo 2010). Für die Identifikation der Typ17-T-Helferzellen wurde deren IL-17-Expression mittels Durchflusszytometer nachgewiesen.

#### 1.4.1 Regulatorische T-Zellen

Schon seit den 1970er Jahren wurde die Existenz immunregulatorischer Zellen, die damals als „Suppressorzellen“ bezeichnet wurden, diskutiert (Gershon & Kondo 1971). Mittlerweile konnten die sogenannten regulatorischen T-Zellen (Tregs; regulatory T cells) als immunsuppressiv wirkende Zellen identifiziert werden. Sie übernehmen während der Aktivierung einer Immunreaktion wichtige Kontrollmechanismen in der Peripherie und auf thymischer Ebene. So sind sie unter anderem für die rechtzeitige Terminierung einer Immunantwort, die Kontrolle der klonalen Expansion, sowie für die Verhinderung einer Immunreaktion gegen Autoantigene unerlässlich.

Man unterscheidet zwei Hauptgruppen von Tregs: Die „natürlichen“, im Thymus generierten  $CD4^+$  ( $CD25^+$ )  $FoxP3^+$  Tregs (nTregs; naturally occurring Tregs), sowie „induzierte“, das heißt in der Peripherie aus  $CD4^+$   $CD25^-$  T-Zellen, unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  und IL-10, entstandene Tregs (iTregs; induced Tregs) (Miyara et al. 2009; Sakaguchi et al. 2008; Sakaguchi et al. 2006). Die natürlichen Tregs sorgen mehrheitlich für die Selbst-Toleranz, während die induzierten Tregs vor allem die Immunreaktion regulieren (Rink et al. 2015). Induzierte Tregs können in zwei Subpopulationen eingeteilt werden, die vor allem durch ihre Zytokinexpression gekennzeichnet sind: Zum einen die  $T_R1$ -Zellen, welche große Mengen an IL-10 sezernieren und zum anderen die  $T_H3$ -Zellen, welche mehrheitlich immunsuppressive Zytokine wie TGF- $\beta$  sezernieren.

Da CD25 nicht nur auf Tregs, sondern auch auf nicht-regulatorischen „konventionellen“ aktivierten T-Zellen exprimiert wird, ist CD25 als alleiniger Treg-Marker ungeeignet (Sakaguchi et al. 2008). Der Transkriptionsfaktor „Forkhead-box-Protein 3“ ( $FoxP3$ ), dessen Expression entscheidend für die Entstehung und Funktion natürlicher Tregs ist, fungiert als weiterer Marker für natürliche Tregs.  $FoxP3$  wird auch durch  $CD4^+$   $CD25^-$  „konventionelle“ T-Zellen und durch iTregs exprimiert, jedoch in einem sehr viel geringeren Ausmaß (Tran et al. 2007). Darüber hinaus ist die  $FoxP3$ -Expression bei den  $CD4^+$   $CD25^-$  „konventionellen“ T-Zellen nur vorübergehend nachweisbar (Wang et al. 2007). Daher gilt  $FoxP3$  als derzeit spezifischster Marker für natürliche Tregs (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). Mit CD127 wurde durch Liu et al. (2006) ein weiterer Marker für Tregs beschrieben. Die Forschungsgruppe postulierte, dass CD127 in sehr geringem Maße auf Tregs exprimiert werde und ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der CD127- und der  $FoxP3$ -Expression, sowie der suppressiven Funktion von natürlichen Tregs

bestehe. CD127 ist als alleiniger Treg-Marker allerdings wenig zuverlässig und sollte mit anderen Markern wie CD25 kombiniert werden (Anderson & Isaacs 2008; Zhang et al. 2008).

Die CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> nTregs können nach Miyara et al. (2009) in drei Subpopulationen eingeteilt werden. Einerseits in die FoxP3<sup>lo</sup> CD45RA<sup>+</sup> resting Tregs (rTregs) und die FoxP3<sup>hi</sup> CD45RA<sup>-</sup> activated Tregs (aTregs), welche beide in vitro immunsuppressive Eigenschaften zeigen. Nach TCR-Aktivierung können rTregs proliferieren und darüber hinaus zu aTregs differenzieren. Dagegen sind aTregs eher anerg und damit unempfindlich gegenüber einem Allergenkontakt. Andererseits gibt es als weitere Subpopulation der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> nTregs die FoxP3<sup>lo</sup> CD45RA<sup>-</sup> non-suppressive Tregs (non-Tregs), die keine immunsuppressiven Effekte aufweisen und proinflammatorische Zytokine exprimieren (Sakaguchi et al. 2010).

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Defekte in der Funktion regulatorischer T-Zellen, sowohl in defizitärer als auch in exzessiver Richtung, wesentlich zur Entstehung und Erhaltung von Autoimmunerkrankungen, malignen Erkrankungen und Infektionen beitragen. Multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ 1 und rheumatoide Arthritis sind nur einige Beispiele für Erkrankungen mit Defekten in der Treg-Funktion (Stephen-Victor et al. 2017; Takeuchi & Nishikawa 2016). Außerdem sollen regulatorische T-Zellen die Transplantatakzeptanz unterstützen sowie eine protektive Funktion in der Graft-versus-host disease besitzen (Beres & Drobyski 2013). CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen können bei Mäusen ab dem dritten Lebenstag nachgewiesen werden. Die Eliminierung dieser Zellpopulation durch Thymektomie führt zur Ausbildung schwerer Autoimmunphänomene. Auch bei Mäusen mit Defekten im FoxP3/„scurfin“ Gen, den sogenannten „scurfy mice“, konnten schwere Immundefekte nachgewiesen werden (Brunkow et al. 2001). Dagegen entwickeln Menschen bei Mutationen im FoxP3-Gen das Immundefektsyndrom IPEX (Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-linked syndrome), welches zum ersten Mal 1982 durch Powell et al. (1982) beschrieben wurde.

Auch deutet vieles darauf hin, dass eine Fehlfunktion oder das Fehlen regulatorischer T-Zellen ein Grund für allergische Erkrankungen und Asthma sein könnte (Stock et al. 2006). So konnten Hartl et al. (2007) beispielsweise eine verringerte Anzahl und eingeschränkte T-Zell-supprimierende Wirkung CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen im Lungengewebe und im peripheren Vollblut asthmakrankter Kinder nachweisen.

## 1.5 Regulatorische B-Zellen

B-Zellen sind neben den T-Zellen die zentralen Akteure der adaptiven Immunität. Als Träger der spezifischen humoralen Immunabwehr steuern sie die Immunantwort über ihre Antikörperproduktion und sorgen für eine lang andauernde Immunität durch die Differenzierung zu Gedächtniszellen (Guzman-Genuino & Diener 2017). Forschungsergebnisse aus den letzten 40 Jahren deuten jedoch darauf hin, dass nicht alle B-Zellen für diesen Zweck bestimmt sind. So beschrieben Katz et al. (1974) bereits im Jahr 1974 B-Zellen mit der Fähigkeit die allergische Spätreaktion in Meerschweinchen zu unterdrücken, was die Annahme nahelegte, dass bestimmte B-Zellen die T-Zell-Funktion hemmen können. Im Jahr 2000 beschrieb Mizoguchi (2000) anhand eines Mausmodells eine B-Zell-Subpopulation, welche die Immunantwort bei Mäusen mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung eher inhibierte anstatt sie zu fördern. Diese B-Zell-Subpopulation wurde als „regulatorische B-Zellen“ oder „Bregs“ klassifiziert.

Wie man heute weiß tragen regulatorische B-Zellen zum Erhalt der Immuntoleranz bei indem sie überschießende inflammatorische Reaktionen im Rahmen von Autoimmunität oder persistierenden Infektionen begrenzen. Zentraler Mediator regulatorischer B-Zellen ist IL-10, das proinflammatorische Zytokinwirkungen inhibiert und die Differenzierung regulatorischer T-Zellen begünstigt (Mauri & Bosma 2012). Weitere Effektor-Mechanismen sind die Suppression der IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Sekretion, sowie die Inhibierung der Differenzierung naiver T-Zellen in Typ1- und Typ17-T-Helferzellen (Flores-Borja et al. 2013). Der Versuch einer einheitlichen phänotypischen Beschreibung regulatorischer B-Zellen ist bisher erfolglos geblieben. IL-10-kompetente CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden innerhalb der CD27<sup>+</sup> B-Gedächtniszellpopulation und der CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> Transitional-B-Zell-Population gefunden (Blair et al. 2010; Bouaziz et al. 2010; Ryotokuji et al. 2015). In dieser Arbeit wurden regulatorische B-Zellen als CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> definiert.

## **1.6 Zielsetzung**

Zur Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale tragen unterschiedliche abnorm ablaufende immunregulatorische Prozesse bei. Da jeder einzelne dieser immunregulatorischen Mechanismen eine hohe Komplexität aufweist ist es nicht verwunderlich, dass die Pathogenese des Asthma bronchiale bis heute nicht vollständig verstanden wird.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit unterschiedlichen Zellen und Proteinen bei denen eine Mitwirkung an immunregulatorischen Mechanismen, die zur Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale beitragen, vermutet wird. Ziel dieser Arbeit ist es, durch das bessere Verständnis dieser immunregulatorischen Abläufe und deren Zusammenspiel, die Pathogenese des Asthma bronchiale besser zu begreifen. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit bei Probanden mit Asthma bronchiale und einer gesunden Kontrollgruppe regulatorische B-Zellen, T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen, sowie mDCs und pDCs aus dem peripheren Vollblut durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurde ein besonderer Fokus auf die Zytokinexpression von T-Helferzellen und von regulatorischen T-Zellen, wie auch auf die Expression T-Zell-kostimulatorischer und T-Zell-koinhibitorischer Moleküle durch mDCs und pDCs gelegt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

#### **2.1.1 Rekrutierung von Probanden**

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurden zwei Gruppen von Studienteilnehmern männlichen und weiblichen Geschlechts im Alter zwischen 20 und 55 Jahren untersucht. Eine Gruppe beinhaltete 20 Probanden mit diagnostiziertem, leichtem allergischem Asthma bronchiale (A), die andere setzte sich aus 20 Normalpersonen (NP) ohne Asthma bronchiale zusammen. Die Normalpersonen sollten als gesunde Kontrollgruppe für die untersuchten Probanden mit Asthma dienen. Alle Probanden wurden schriftlich und mündlich über Ziel und Durchführung der Studie informiert und gebeten, einen Fragebogen auszufüllen. Dieser enthielt Fragen zu Geburtsdatum, Gewicht, Körpergröße, Raucherstatus, Medikation, Grunderkrankungen, sowie allergischen Erkrankungen. Bei schriftlicher Einverständniserklärung und Erfüllung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden die Probanden in die Studie aufgenommen.

#### **2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Ausschlusskriterien für Normalpersonen:

- klinische oder laborchemische Zeichen einer akuten infektiösen Erkrankung
- Vorliegen einer chronischen Erkrankung
- positive Raucheranamnese
- Einnahme immunsupprimierender Medikamente
- Gesamt-IgE-Konzentration im Serum > 100 kU/L
- positiver Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen häufige Inhalationsantigene unter Verwendung des SX1-Tests von Pharmacia Diagnostics ( $\geq 0,35$  kU/L bzw.  $\geq$  CAP-Klasse 1)

Ausschlusskriterien für Probanden mit Asthma:

- klinische oder laborchemische Zeichen einer akuten infektiösen Erkrankung
- Vorliegen einer anderen chronischen Erkrankung als Asthma bronchiale
- positive Raucheranamnese
- Einnahme immunsupprimierender Medikamente
- Einnahme von Medikamenten zur Asthmatherapie mit Ausnahme eines kurzwirksamen Beta-2-Sympathomimetikums zur Notfalltherapie

Einschlusskriterien für Probanden mit Asthma:

- positiver Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen häufige Inhalationsantigene unter Verwendung des SX1-Tests von Pharmacia Diagnostics ( $\geq 0,35$  kU/L bzw.  $\geq$  CAP-Klasse 1)
- klinische Diagnose eines leichten allergischen Asthma bronchiale

Bezüglich Alter (Median: NP: 25 Jahre vs. A: 25 Jahre) und Geschlecht (NP: m= 9, w= 11 vs. A: m= 7, w= 13) unterschied sich die Gruppe der Probanden mit Asthma nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die detaillierten Charakteristika der Probanden mit Asthma sind der Tab. 2-1 zu entnehmen.

**Tab. 2-1: Patientencharakteristika.** Dargestellt ist das Geschlecht, das Alter, die Gesamt-IgE-Konzentration, die FEV<sub>1</sub> in Absolutwerten und als prozentualer Anteil des alters- und geschlechtsspezifischen Normwertes, sowie die Bedarfsmedikation der Probanden mit Asthma. SABA = kurzwirksamer Beta-2-Agonist; OAH = orales Antihistaminikum

Geschlecht	Alter	Total IgE (kU/L)	FEV <sub>1</sub> (L)	FEV <sub>1</sub> (% vom Soll)	Medikation
m	27	181	6,43	127,1	-
m	35	41,1	-	-	SABA
m	28	48,2	4,87	102,1	-
m	25	28,6	3,94	87	SABA
m	24	175	3,88	83,4	SABA
m	26	791	-	-	-
m	25	53,3	4,09	87	-
w	22	150	3,82	112	-
w	20	278	2,61	80,3	SABA
w	21	22,2	2,92	81,8	SABA
w	23	268	4,14	124,1	-
w	23	537	3,02	96,3	SABA
w	21	1143	3,04	90	-
w	27	298	2,75	89	SABA, OAH
w	55	50,8	2,4	101	-
w	25	68,1	3,85	104	-
w	22	1345	2,53	77	SABA
w	29	253	2,15	70	-
w	26	215	3,18	98	OAH
w	22	759	3,14	93	SABA

## 2.2 Gewinnung der Blutproben

### Materialien:

Stauschlauch

Sterile Wattetupfer

Hautdesinfektionsmittel OCTENIDERM [SCHÜLKE/MAYR, Norderstedt, D]

Blutentnahmekanüle 0,8 x 38 mm [STARSTEDT AG, Nümbrecht, D]

Monovette EDTA 9 ml [STARSTEDT AG, Nümbrecht, D]

Monovette Serum 9 ml [STARSTEDT AG, Nümbrecht, D]

### Methode und Durchführung:

Bei jedem Probanden erfolgte eine zweizeitige Blutentnahme. Vor der Aufnahme der Probanden in die Studie wurde eine 2,7 ml fassende Serum-Monovette zur Bestimmung der Gesamt-IgE-Konzentration und spezifischer IgE-Antikörper mit Blut befüllt.

Bei Erfüllung aller Ein- und Ausschlusskriterien erfolgte die Aufnahme der Probanden in die Studie und es schloss sich eine zweite Blutentnahme an. Hierbei wurden zwei 9 ml fassende EDTA-Monovetten und eine 9 ml fassende Serum-Monovette mit Blut aufgefüllt. Bis zu ihrer weiteren Verarbeitung wurden die EDTA-Monovetten im Kühlschrank bei + 8 °C gelagert.

Die Serum-Monovette wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend für 5 Minuten bei 3500 g und 8 °C zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde nach Aliquotierung in Eppendorf-Röhrchen für spätere ELISA-Experimente bei -80 °C aufbewahrt. Um den möglichen Einfluss tageszeitabhängiger Vorgänge auf die im Blut zu untersuchenden Parameter zu minimieren erfolgte die zweite Blutentnahme bei allen Studienteilnehmern zwischen 6 und 8 Uhr morgens. Das Blut wurde bei beiden Blutentnahmen aus einer Vena cubitalis entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten nach den allgemein gültigen Hygieneregeln. Um ein Nachbluten zu verhindern wurden die Punktionsstellen nach dem Entfernen der Kanülen mit einem Verband versorgt.

## 2.3 Gesamt-IgE-Konzentration und spezifische IgE-Antikörper

Bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale können in der Regel eine erhöhte Gesamt-IgE-Konzentration und spezifische IgE-Antikörper gegen Inhalationsantigene nachgewiesen werden.

Die Gesamt-IgE-Konzentration und die spezifischen IgE-Antikörper gegen die häufigsten Inhalationsantigene wurden bei allen potentiellen Probanden untersucht, da deren Konzentrationen ausschlaggebend für die Aufnahme der Probanden in die Studie bzw. deren Ausschluss von der Studie waren. Für die IgE-Bestimmungen wurde das

UniCAP100-System der Firma Pharmacia Diagnostics, das auf einem Fluoreszenzimmunoassay basiert, verwendet.

Bei der Bestimmung des Gesamt-IgEs diene ein immobilisierter Anti-IgE-Antikörper als Fänger für die IgE-Moleküle aus dem Serum der Probanden. Bei der Bestimmung des spezifischen IgEs diene dagegen eine Mischung aus immobilisierten Inhalationsantigenen bzw. deren Komponenten als Antikörperfänger. Für die spezifische IgE-Bestimmung wurde der rein qualitative SX1-Test von Pharmacia Diagnostics verwendet, der IgE-Antikörper gegen Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß, Cladosporium herbarum, Dermatophagoides pteronyssinus, Katzenschuppen und Hundeschuppen nachweist. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde bei beiden Verfahren ein  $\beta$ -Galaktosidase-gekoppelter Anti-IgE-Antikörper und das Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers und mit dessen Reagenzien durchgeführt.

## **2.4 Spirometrie**

Die Spirometrie ist eine Routineuntersuchung der Lungenfunktionsdiagnostik bei der Atemvolumina und Luftflussgeschwindigkeiten mit einem handlichen Pneumotachographen bestimmt werden. Sie ist relativ einfach durchzuführen und für den Patienten nahezu nebenwirkungsfrei. In dieser Arbeit sollte die Spirometrie dazu dienen die forcierte expiratorische Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ; forced expiratory volume in 1 second) bei allen Probanden mit Asthma zu bestimmen. Bei der  $FEV_1$  handelt es sich um das Atemvolumen, das nach tiefer Inspiration mit voller Kraft innerhalb der ersten Sekunde ausgeatmet werden kann. Je nach Therapie und Schweregrad des Asthma bronchiale kann dieser Wert stark erniedrigt sein. Bei Gesunden sollte die  $FEV_1 \geq 90\%$  des alters- und geschlechtsspezifischen Normwertes liegen. Zur Durchführung der Untersuchung wird der Patient nach zwei bis drei Atemzyklen des ruhigen Atmens dazu aufgefordert bei der nächsten Expiration möglichst tief auszuatmen und dann bei der folgenden Inspiration ein maximales Atemvolumen einzuatmen. Aus dieser maximalen Inspirationsstellung heraus soll der Patient nun mit größtmöglicher Kraftanstrengung in das Mundstück des Pneumotachographen ausatmen, bis er wieder die maximale endexpiratorische Stellung erreicht hat. Hierbei wird der Druck vor und nach einem Atemwiderstand aufgezeichnet, wobei der Druckabfall bei laminarer Strömung direkt proportional zur Atemstromstärke ist. Ein mit dem Pneumotachographen verbundener Prozessor kann daraus die  $FEV_1$  und weitere für die Lungenfunktionsdiagnostik wichtige Parameter berechnen.



## 2.5 Isolierung, Differenzierung und Kultivierung von Zellen

### 2.5.1 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

#### Geräte und Materialien:

Zentrifuge HERAEUS MEGAFUGE 1,0 R	[KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Hanau, DE]
Sterilbank MICROFLOW	[NUNC, Wiesbaden, DE]
Pipettierhilfe ACCU-JET	[BRAND, Wertheim, DE]
Pipette RESEARCH 100 -1000 µl	[EPPENDORF, Hamburg, DE]
Pipette RESEARCH 2-20 µl	[EPPENDORF, Hamburg, DE]
Pipettenspitzen 25 ml	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Pipettenspitzen 5 ml	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Pipettenspitzen 1000 µl	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Pipettenspitzen 200 µl	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Falcon-Röhrchen 50 ml	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Blood-separation-filter-tube SEP-MATE 50 ml	[STEMCELL TECHNOLOGIES, Vancouver, CA]

#### Reagenzien:

Zellseparationsmedium BIOCOLL	[BIOCHROM AG, Berlin, D]
DUBLECO'S PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	[GIBCO, New York, US]
Nährmedium X-VIVO-15	[LONZA, Basel, CHE]

#### Lösungen:

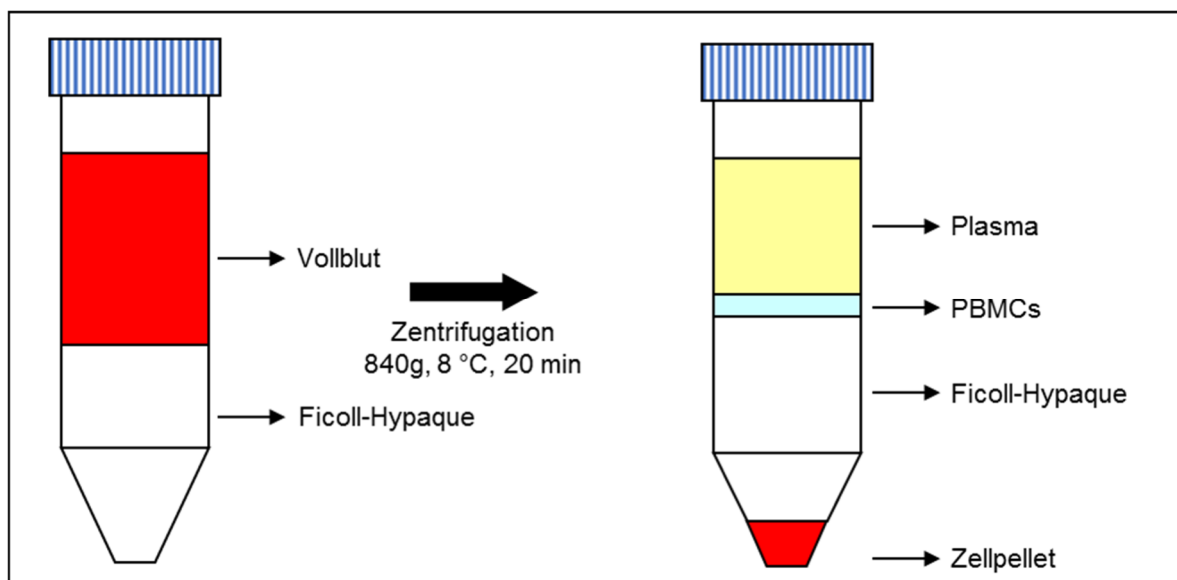
Nährmedium A: 20 ml Nährmedium X-VIVO-15 + 400 µl Probandenplasma

#### Methode und Durchführung:

Neben flüssigen Anteilen enthält humanes Vollblut zelluläre Bestandteile, welche in Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten klassifiziert werden können. Leukozyten lassen sich in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten subklassifizieren. Lymphozyten, Monozyten und die sogenannten dendritischen Zellen bilden zusammen die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Zur Isolation der PBMCs aus dem humanen Vollblut kam eine Dichtegradientenzentrifugation, welche die Tatsache nutzt, dass sich die unterschiedlichen Zellpopulationen in ihrer Dichte unterscheiden, zum Einsatz.

Unter der Sterilbank im Laminar Flow wurde das durch EDTA antikoagulierte Vollblut eines Probanden im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Eine sterile 50 ml Blood-separation-filter-Tube wurde mit 17 ml Ficoll-Hypaque-Lösung als Separationsmedium (Dichte: 1,077 g/ml) bestückt und anschließend für 2 Minuten bei 840 g und 8 °C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation sammelte sich das Separationsmedium unterhalb und auf Höhe der in die Tubes integrierten Filterplatte, wodurch in einem nächsten Schritt eine vorsichtige Übersichtung des Separationsmediums mit dem verdünnten und antikoagulierten Probandenblut stattfinden konnte. Die integrierte Filterplatte unterstützte bei diesem Schritt eine möglichst geringe Vermischung der beiden Phasen. Danach wurde die Blood-separation-filter-Tube für 20 Minuten bei 840 g, 8 °C und inaktivierter Bremse zentrifugiert, wodurch eine schnelle Separation der Zellpopulationen nach ihrer Dichte möglich war. Da Erythrozyten und neutrophile- und eosinophile Granulozyten eine höhere Dichte als die Ficoll-Hypaque-Lösung besitzen können sie während der Zentrifugation in das Medium eindringen und am Boden der Tube pelletieren. Thrombozyten dagegen verbleiben zum größten Teil im Plasma, da sie aufgrund ihres geringen Zellvolumens langsamer sedimentieren. Die PBMCs haben eine geringere Dichte als die Ficoll-Hypaque-Lösung und sammeln sich deshalb als milchig-trübe Interphase am Übergang zwischen Plasma und Separationsmedium (Abb. 2-1). Auch basophile Granulozyten und einige Thrombozyten kommen bei Anwendung dieser Zellseparationsmethode typischerweise in der beschriebenen Interphase vor (Luttmann et al. 2014). Für die weiteren Untersuchungen war diese Kontamination jedoch unerheblich.



**Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation.**

Im nächsten Schritt wurde das Plasma bis kurz oberhalb des Zellringes aus PBMCs in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Danach konnte die PBMC-Fraktion vorsichtig in ein neues 50 ml-Falcon-Röhrchen abpipettiert werden und dieses anschließend bis zu einem Volumen von 50 ml mit PBS befüllt werden. Nun folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei

300 g und 8 °C. Im Anschluss wurde der Überstand abgeschüttet und das entstandene Zellpellet mit 3,9 ml Nährmedium A resuspendiert.

Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl der Suspension mittels Neubauer-Zählkammer.

## 2.5.2 Zellzählung und Einstellung der Zellzahl

### Materialien:

Zellsuspension

Neubauer-Zählkammer

[BRAND, Wertheim, DE]

Lichtmikroskop WILOVERT S

[HELMUT HUND, Wetzlar, DE]

Türksche Lösung

[MERCK, Darmstadt, DE]

Reaktionsgefäß 1,5 ml

[STARSTEDT AG, Nümbrecht, DE]

Pipette RESEARCH 10 -100 µl

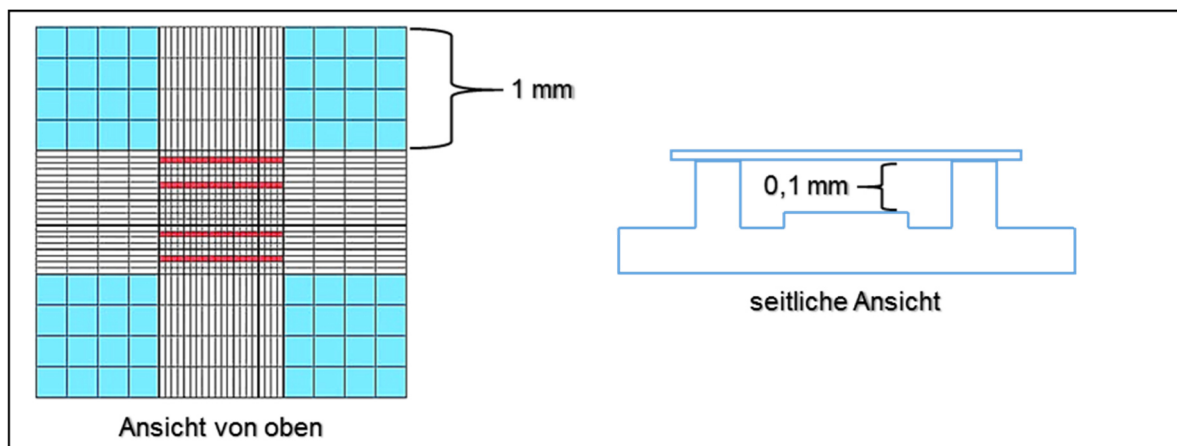
[EPPENDORF, Hamburg, DE]

Pipettenspitzen 200 µl

[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]

### Methode und Durchführung:

Die Ermittlung der Zellzahl der gewonnenen Suspension erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer (Abb. 2-2). Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und anschließend im Verhältnis 1:10 mit Türkscher Lösung verdünnt. Nach 5-minütiger Inkubationszeit und ausreichender Resuspension wurde die Neubauer-Zählkammer befüllt und 4 Großquadranten unter dem Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter ergab sich indem der Mittelwert der Zellzahl aus den vier Großquadranten bestimmt wurde und anschließend mit  $10^5$  multipliziert wurde. Die übrige Zellsuspension konnte im Anschluss soweit mit Nährmedium A verdünnt werden bis eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml vorlag.



**Abb. 2-2: Neubauer Zählkammer.**

Das Zählnetz setzt sich aus neun großen Quadranten zusammen. Die blau dargestellten Quadrate dienen der Leukozytenzählung. Beidseits des Zählnetzes befinden sich zwei Stege, über denen ein Deckglas platziert wird. Wenn dieses satt aufliegt besteht zwischen Zählnetz und Deckglas ein Abstand von 0,1 mm (Kammertiefe). Das erfasste Volumen entspricht bei einem großen Quadrat 0,1  $\mu\text{l}$  (1 mm x 1 mm x 0,1 mm). Quelle: In Anlehnung an "Die manuelle (mikroskopische) Zellzählung". Interaktives Lernprogramm HemoSurf, Version 3,0, Universität Bern 2016).

### 2.5.3 Zellkultur

#### Materialien:

Brutschrank CELLSTAR	[NUNC, Wiesbaden, DE]
Sterilbank MICROFLOW	[NUNC, Wiesbaden, DE]
24-Well-Zellkulturplatte	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Cell Activation Cocktail (with Brefeldin A)	[BIOLEGEND, San Diego, US]
Monensin Solution (1,000X)	[BIOLEGEND, San Diego, US]
Pipette RESEARCH 100-1000 $\mu\text{l}$	[EPPENDORF, Hamburg, DE]
Pipette RESEARCH 2-20 $\mu\text{l}$	[EPPENDORF, Hamburg, DE]
Pipettenspitzen 1000 $\mu\text{l}$	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Pipettenspitzen 200 $\mu\text{l}$	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Falcon-Röhrchen 15 ml	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]

#### Methode und Durchführung:

Um die Zytokinsynthese der isolierten PBMCs zu untersuchen wurde der Cell Activation Cocktail von BioLegend verwendet. Dieser enthält das  $\text{Ca}^{2+}$ - Inophore Ionomycin und PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) zur Stimulation der zellulären Zytokinsynthese. Durch das ebenfalls im Cell Activation Cocktail enthaltene Brefeldin A und auch durch Monensin-Solution wird der intrazelluläre Proteintransport gehemmt und es kommt zur Akkumulation von Zytokinen und anderen sekretorischen Proteinen im endoplasmatischen Retikulum und

im Golgi-Apparat der Zelle (Jung et al. 1993). Durch die gehemmte Proteinsekretion wird eine Detektion des intrazellulären Zytokinvorkommens durch durchflusszytometrische Verfahren verbessert.

Eine Vertiefung (Well) einer 24-Well-Zellkulturplatte wurde zunächst mit 2 ml der vorbereiteten mit PBMCs angereicherten Zellsuspension ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) befüllt. Im Anschluss wurden 20 µl Cell Activation Cocktail und 2 µl Monensin-Solution hinzugefügt. Nach ausreichender Resuspension wurde die Wellplatte für 5 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und einer fünfprozentigen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Darauffolgend wurde der Überstand aus dem Well entnommen und in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen zur sofortigen weiteren Verarbeitung überführt.

## 2.6 Durchflusszytometrie

### 2.6.1 Geräte und Materialien

Durchflusszytometer FACSCalibur	[BECTON & DICKINSON, Heidelberg, DE]
FACS-Software CellQuest Pro	[BECTON & DICKINSON, Heidelberg, DE]
Röhrchen FACS 5 ml	[BECTON & DICKINSON, Heidelberg, DE]
TruCount-Röhrchen	[BECTON & DICKINSON, Heidelberg, DE]
Zentrifuge HERAEUS MEGAFUGE 1,0 R	[KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Hanau, DE]
Pipette RESEARCH 100-1000 µl	[EPPENDORF, Hamburg, DE]
Pipette RESEARCH 2-20 µl	[EPPENDORF, Hamburg, DE]
Pipettenspitzen 5 ml	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Pipettenspitzen 1000 µl	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Pipettenspitzen 200 µl	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]

### Reagenzien:

DUBLECO'S PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	[GIBCO, New York, US]
Fetales Kälberserum (FCS)	[SIGMA, Deisenhofen, DE]
FACS Lysing Solution (10x)	[BECTON & DICKINSON, Heidelberg, DE]
Cell-Staining-Buffer	[BIOLEGEND, San Diego, US]
FOXP3-Fix/Perm-Buffer (4x)	[BIOLEGEND, San Diego, US]
FOXP3-Perm-Buffer (10x)	[BIOLEGEND, San Diego, US]

### Lösungen:

Waschpuffer:	PBS+2% FCS <sub>inakt.</sub>
Erythrozyten-Lysispuffer:	FACS Lysing Solution (10x) im Verhältnis 1:10 mit H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> verdünnt
Permeabilisierungspuffer:	0,1% Saponin in Waschpuffer

FOXP3-Fix/Perm-Lösung: FOXP3 Fix/Perm Buffer (4x) im Verhältnis 1:4 mit  
DUBLECO'S PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

FOXP3-Perm-Lösung: FOXP3 Perm Buffer (10x) im Verhältnis 1:10 mit  
DUBLECO'S PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

### Antikörper:

Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 2-2 aufgeführt.

**Tab 2-2: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrischen Messungen.**

Die in dieser Arbeit benutzten Antikörper sind mit Markierung, Isotyp und Klonbezeichnung, wie sie vom Hersteller bezogen wurden, aufgeführt.

Antigen	Markierung	Isotyp	Klon	Hersteller
CD4	FITC	IgG1	RPA-T4	BioLegend
CD5	FITC	IgG1	UCHT2	BioLegend
Lin 1 Cocktail				Becton & Dickinson
CD3	FITC	IgG1	SK7	
CD14	FITC	IgG2b	MoP9	
CD16	FITC	IgG1	3G8	
CD19	FITC	IgG1	SJ25C1	
CD20	FITC	IgG1	L27	
CD56	FITC	IgG2b	NCAM16.2	
Isotypkontrolle	FITC	IgG1	PPV-06	ImmunoTools

CD24	PE	IgG2a	ML5	BioLegend
CD25	PE	IgG1	ACT-1	Dako
CD123	PE	IgG1	9F5	Becton & Dickinson
CD11c	PE	IgG2b	S-HCL-3	Becton & Dickinson
FoxP3	PE	IgG1	259D	BioLegend
Granzym B	PE	IgG1	GB11	Immunotools
IL-4	PE	IgG1	8D4-8	BioLegend
IL-5	PE	IgG1	TRFK5	Becton & Dickinson
IL-10	PE	IgG1	JES3-9D7	Caltag
IL-13	PE	IgG1	JES10-5A2	Becton & Dickinson
IL-17	PE	IgG1	BL168	BioLegend
IFN- $\gamma$	PE	IgG1	B27	BoiLegend
ICOS-L	PE	IgG2b	2D3	BioLegend
Isotypkontrolle	PE	IgG1	MOPC-21	BioLegend

CD3	PerCP	IgG1	SK7	Becton & Dickinson
CD19	PerCP	IgG1	HIB19	BioLegend
HLA-DR	PerCP	IgG2a	L243	Becton & Dickinson
CD45	PerCP	IgG1	2D1	Becton & Dickinson
CD3	PerCP-Cy5.5	IgG1	UCHT1	BioLegend

CD38	APC	IgG1	HIT2	BioLegend
CD45RA	APC	IgG2b	HI100	Becton & Dickinson
CD127	APC	IgG1	A019D5	BioLegend

PD-L1	APC	IgG2b	29E.2A3	BioLegend
CD86	APC	IgG2b	IT2.2	BioLegend
CCR9	APC	IgG2a	48311	R&D Systems
CD123	APC	IgG2a	AC145	Miltenyi Biotec
CD11c	APC	IgG2b	S-HCL-3	Becton & Dickinson
Isotypkontrolle	APC	IgG1	X40	Becton & Dickinson

FoxP3	Alexa 647	IgG1	259D	BioLegend
Isotypkontrolle	Alexa 647	IgG1	259D	BioLegend

### 2.6.2 Methode

Die ersten kommerziell erhältlichen Durchflusszytometer wurden Ende der 1960er Jahre hergestellt. Seitdem haben sich die grundlegenden Prinzipien der Funktionsweise eines Durchflusszytometers nur wenig verändert.

Zellen einer Probe werden durch Luftdruck auf das Probenröhrchen über eine Kapillare einer Messküvette zugeführt. Innerhalb der Messküvette wird die Probenflüssigkeit von einer Trägerflüssigkeit mitgerissen und zu einem laminaren Probenstrom ausgezogen. Dieses Verfahren ermöglicht es, dass Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Durch die im Probenstrom enthaltenen Zellen kommt es zur Streuung des Lichtes in der Messküvette. Das so genannte Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC) entsteht durch Streuung der Lichtstrahlen in Verlängerung der Richtung des Laserstrahls und ist ein Maß für die Größe einer Zelle. Dagegen entsteht das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) durch das an Strukturen innerhalb der Zelle in einem Winkel von 90° reflektierte Licht und gibt Auskunft über die Granularität einer Zelle. Durch Detektion dieser beiden Parameter ist eine Klassifikation der Leukozyten in die Subpopulationen Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten möglich. Eine Beurteilung von Zellen nach ihren Oberflächeneigenschaften oder ihrer intrazellulären Zusammensetzung wird durch Antigen-Markierung mit fluoreszenzfarbstoffgekoppelten spezifischen Antikörpern möglich. Hierbei wird ein Teil der Lichtenergie des Laserstrahls durch das entsprechende Fluorochrom absorbiert und Fluoreszenzlicht mit höherer Wellenlänge emittiert. Eine Detektion des Lichts ist über eine Auftrennung der abgehenden Strahlung nach ihren Wellenlängenbereichen durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern möglich. Die Intensitäten der Wellenlängen korrelieren dann mit der Menge an gebundenen Antikörpern, welche wiederum proportional zur Menge an Antigenen ist.

Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer besitzt einen Argonionenlaser und einen Helium-Neon-Laser, welche monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm bzw. 633 nm aussenden. Für die Antigen-Markierung wurden ausschließlich Antikörper, die mit den in Tab. 2-3 genannten Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren verwendet.

**Tab. 2-3: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome und die für deren Anregung benutzte Wellenlänge des Laserlichts.**

Quelle: In Anlehnung an Luttmann et al. (2014), S. 80.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Anregungswellenlänge (nm)
FITC	495	519	488
PE	480	578	488
PerCP	482	678	488
APC	650	660	633
PerCP/Cy5.5	482	695	488
Alexa Fluor 647	650	668	633

Je nach Software mit der das Durchflusszytometer ausgestattet ist kommen unterschiedliche Arten der Darstellung der erhobenen Daten zum Einsatz. In dieser Arbeit wurde zur Auswertung der Messergebnisse die Software „CellQuest Pro“ (Becton & Dickinson, Heidelberg, DE) verwendet und deren Darstellung erfolgte größtenteils in zweidimensionalen Dot-Plots. Diese werden in der Regel benutzt, um die Beziehung zweier gemessener Parameter zu demonstrieren. So können beispielsweise Größe (FSC) und Granularität (SSC) an den Koordinatenachsen des Dot-Plots gegeneinander aufgetragen werden. Eine Zelle stellt sich dann als schwarzer Punkt, mit einer Lage innerhalb des Dot-Plots gemäß den bei ihr gemessenen Daten, dar. Die entstehenden Punktwolken entsprechen den unterschiedlichen Zellpopulationen. Um eine genauere Charakterisierung unterschiedlicher Zellpopulationen in Abhängigkeit ihrer Fluoreszenzeigenschaften vorzunehmen, können einzelne Populationen mittels eines durch die Software gesetzten Gates ausgewählt werden. So wird es beispielsweise möglich, Leukozyten nicht nur in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten zu klassifizieren, sondern auch eine weitere Einteilung einer einzelnen Population anhand spezifischer Antigene vorzunehmen. Für eine exakte Auswertung von Versuchsergebnissen ist eine Isotypkontrolle notwendig. Hierzu werden unspezifische Antikörper, die mit dem selben Fluorochrom konjugiert sind wie die Testantikörper genutzt, um das Ausmaß an Hintergrundsignal durch unspezifische Bindung der Testantikörper an Zellen und Zelltrümmer abschätzen zu können.



### 2.6.3 Durchführung

#### 2.6.3.1 Markierung von Oberflächenantigenen auf Vollblutleukozyten

Zur Markierung der Oberflächenantigene auf Vollblutleukozyten wurden die unterschiedlichen Antikörper nach dem Schema in Tab. 2-4 in FACS-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 75 µl EDTA-Vollblut eines Probanden versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Um die im Vollblut vorhandenen Erythrozyten osmotisch zu lysieren und die Leukozyten zu fixieren wurde in einem nächsten Schritt 1 ml des Erythrozyten-Lysispuffer zugegeben. An eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit schloss sich das Abzentrifugieren der Zellen für 5 Minuten bei 400 g und 8 C° an. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen. Danach folgte ein Waschschritt. Hierzu wurde 1 ml Waschpuffer zu jedem Ansatz hinzugefügt woraufhin eine 5-minütige Zentrifugation bei 400 g und 8 C° folgte. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, konnten die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert werden. Es folgte die durchflusszytometrische Messung.

**Tab. 2-4: Ansätze für die FACS-Markierung von Oberflächenantigenen auf Vollblutleukozyten.**

Die unterschiedlichen Zellpopulationen wurden jeweils mit den vier Antikörper-gekoppelten-Fluorochromen FITC, PE, PerCP und APC gefärbt; Tregs = regulatorische T-Zellen; Bregs = regulatorische B-Zellen; pDCs = plasmazytoide dendritische Zellen; mDCs = myeloide dendritische Zellen

Nr.	FITC	PE	PerCP	APC	Ziel
1	CD4	CD25	CD3	CD127	Tregs
2	IgG	CD24	CD19	CD38	Bregs
3	CD5	CD24	CD19	CD38	
4	Lin	CD123	HLA-DR	IgG	pDCs
5	Lin	CD123	HLA-DR	PD-L1	
6	Lin	CD123	HLA-DR	CD86	
7	Lin	CD123	HLA-DR	CCR9	
8	Lin	IgG	HLA-DR	CD123	
9	Lin	ICOS-L	HLA-DR	CD123	
10	Lin	CD11c	HLA-DR	IgG	mDCs
11	Lin	CD11c	HLA-DR	PD-L1	
12	Lin	CD11c	HLA-DR	CD86	
13	Lin	IgG	HLA-DR	CD11c	
14	Lin	ICOS-L	HLA-DR	CD11c	

### 2.6.3.2 Markierung von intrazellulären Antigenen in Vollblutleukozyten

Die Markierung intrazellulärer Antigene besteht im Allgemeinen aus drei Schritten: Fixierung der Zellen, Permeabilisierung der Zellmembran und Antikörperbindung. Um eine Identifikation der Zielzellen zu ermöglichen, erfolgte jedoch noch vor einer Markierung intrazellulärer Antigene eine Markierung von Oberflächenantigenen.

Hierfür wurden die in Tab. 2-5 genannten, mit Fluorochrom-gekoppelten-Antikörper zur Färbung von Oberflächenantigenen in FACS-Röhrchen vorgelegt und mit jeweils 75 µl EDTA-Vollblut vermengt. Danach schlossen sich wie bereits in 2.6.3.1 beschrieben eine 20-minütige Inkubation der Proben und eine Erythrozytenlyse und Leukozytenfixierung mit folgender 10-minütiger Inkubation an. Hierauf folgten eine 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 400 g und das anschließende Verwerfen des Überstandes. Um Antikörpern den Durchtritt durch die Zellmembran zu ermöglichen, wurden die Zellen in 1 ml Permeabilisierungspuffer resuspendiert und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit (Tab. 2-5). Nun folgte ein weiterer Waschschrift mit Permeabilisierungspuffer. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert.

**Tab. 2-5: Ansätze für die FACS-Markierung von intrazellulären Antigenen in Vollblutleukozyten.**

Die Zellen wurden mit den vier Antikörper-gekoppelten-Fluorochromen FITC, PE, PerCP und APC gefärbt.  
pDCs = plasmazytoide dendritische Zellen

\*Fluorochrom-gekoppelte-Antikörper zur Markierung intrazellulärer Antigene

Nr.	FITC	PE	PerCP	APC	Ziel
15	Lin	IgG*	HLA-DR	CD123	pDCs
16	Lin	Granzym B*	HLA-DR	CD123	

### 2.6.3.3 Markierung von intrazellulären Antigenen in isolierten PBMCs

Zuerst wurden die in Tab. 2-6 genannten Antikörper gegen Oberflächenantigene in FACS-Röhrchen vorgelegt und mit 100 µl der im Vorfeld erarbeiteten PBMC-reichen Zellsuspension vermengt (siehe 2.5.1 und 2.5.2). Danach wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Es folgte ein Waschschrift, wobei die Zellen jeweils mit 1 ml FCS- und Natriumazid-haltigem Cell-Staining-Buffer versetzt und dann abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen. Als nächstes wurden die Ansätze zur Fixierung der Zellen mit jeweils 0,9 ml FOXP3-Fix/Perm-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen erfolgte

zuerst ein Waschschrift mit 1 ml Cell-Staining-Buffer und daraufhin ein weiterer Waschschrift mit 0.9 ml FOXP3-Perm-Lösung. Zur Permeabilisierung erfolgte die Inkubation der Zellen für 15 Minuten mit 0,9 ml FOXP3-Perm-Lösung bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Es schloss sich eine 5-minütige Zentrifugation bei 400 g an. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Fluorochrom-gekoppelten-Antikörper zur Markierung intrazellulärer Antigene zugegeben (Tab. 2-5). Auf eine 20-minütigen Inkubationszeit folgten 2 weitere Waschschriffe mit Cell-Staining-Buffer. Nach Zugabe von 200 µl PBS konnten die Ansätze mit dem Durchflusszytometer gemessen werden.

**Tab. 2-6: Ansätze für die FACS-Markierung von intrazellulären Antigenen in isolierten PBMCs.**

Die Zellen wurden mit den vier Antikörper-gekoppelten-Fluorochromen FITC, PE, PerCP und APC gefärbt.

Tregs = regulatorische T-Zellen

\* Fluorochrom-gekoppelte-Antikörper zur Markierung intrazellulärer Antigene

Nr.	FITC	PE	PerCP	APC/A647	Ziel
17	CD4	IgG*	CD3	IgG*	Tregs
18	CD4	CD25	CD3	FoxP3*	
19	CD4	FoxP3*	CD3	CD45RA	

#### 2.6.3.4 Markierung von intrazellulären Antigenen in isolierten PBMCs nach Stimulation mit PMA und Ionomycin

Nach einer 5-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde die 2 ml fassende PBMC-reiche Zellsuspension aus dem Well der 24-Well-Zellkulturplatte in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Dann folgte ein Waschschrift mit 8 ml Waschpuffer und einer 5-minütigen Zentrifugation bei 400 g. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 700 µl Waschpuffer resuspendiert. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen Oberflächenantigene wurden nun nach dem Schema in Tab. 2-7 auf die einzelnen Ansätze verteilt und mit 100 µl der Zellsuspension vermengt. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit.

Aufgrund einer vermehrten Internalisierung von CD4-Molekülen durch Stimulation der PBMCs mit PMA und Ionomycin erfolgte die Zugabe der Anti-CD4-Antikörper erst nach Permeabilisierung der Zellen. Somit ließen sich die CD4<sup>+</sup>-Zellen besser anfärben. Das weitere Prozedere unterschied sich nicht von der Vorgehensweise in 2.6.3.3.

**Tab. 2-7: Ansätze für die FACS-Markierung von intrazellulären Antigenen in isolierten PBMCs nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.**

Die Zellen wurden mit den vier Antikörper-gekoppelten-Fluorochromen FITC, PE, PerCP und APC gefärbt.

\* Fluorochrom-gekoppelte-Antikörper zur Markierung intrazellulärer Antigene

Nr	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	A647	Ziel
20	CD4*	IgG*	CD3	IgG*	CD4-T-Zellen
21	CD4*	IL-4*	CD3	FoxP3*	
22	CD4*	IL-5*	CD3	FoxP3*	
23	CD4*	IL-10*	CD3	FoxP3*	
24	CD4*	IL-13*	CD3	FoxP3*	
25	CD4*	IL-17*	CD3	FoxP3*	
26	CD4*	IFN- $\gamma$ *	CD3	FoxP3*	

### 2.6.3.5 Bestimmung der absoluten Zellzahl von Leukozyten, B-Zellen und T-Helferzellen im Vollblut

Um die Anzahl an Leukozyten, B-Zellen und T-Helferzellen pro  $\mu\text{l}$  Vollblut zu bestimmen, wurde das TruCount-System von Becton und Dickinson (Heidelberg, DE) nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurden 30  $\mu\text{l}$  Antikörpermix bestehend aus 5  $\mu\text{l}$  Anti-CD45-PerCP-Cy5.5, 5  $\mu\text{l}$  Anti-CD19-PE (1:10) und 20  $\mu\text{l}$  CD4-FITC (1:10) mit 50  $\mu\text{l}$  Vollblut vorsichtig auf das Gitter eines TruCount-Röhrchens pipettiert und im Anschluss mit den enthaltenen fluoreszenten Mikropartikeln (beads) vermischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurden 450  $\mu\text{l}$  Erythrozyten-Lysispuffer zugegeben. Nun folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit woran sich die durchflusszytometrische Messung anschloss.

Leukozyten wurden als CD45<sup>+</sup>, B-Zellen als CD45<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> und T-Helferzellen als CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> eingegrenzt. Die Quantifizierung der Zellpopulationen konnte aufgrund der bekannten Anzahl an beads pro TruCount-Röhrchen nach folgender Formel erfolgen:

$$\frac{\text{Anzahl an gemessenen Zellen der Population}}{\text{Anzahl an gemessenen beads}} \times \frac{\text{Gesamtzahl an beads pro Test}}{\text{Testvolumen}} = \text{Zellzahl (pro } \mu\text{l)}$$

## 2.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

### Geräte und Materialien:

Photometer ANTHOS HT3	[ANTHOS MICROSYSTEME, Friesoythe, DE]
Zentrifuge HERAEUS MEGAFUGE 1,0 R	[KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Hanau, DE]
Schüttler THE BELLY DANCER	[STOVALL LIFE SCIENCE INC., Greensboro, US]
Multichannel-Pipette	[EPPENDORF, Hamburg, DE]
Pipette RESEARCH 100 -1000 µl	[EPPENDORF, Hamburg, DE]
Pipette RESEARCH 2-20 µl	[EPPENDORF, Hamburg, DE]
Pipettenspitzen 1000 µl	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Pipettenspitzen 200 µl	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]
Mikrotiterplatten, 96 Wells	[GREINER BIOONE, Frickenhausen, DE]

### Reagenzien

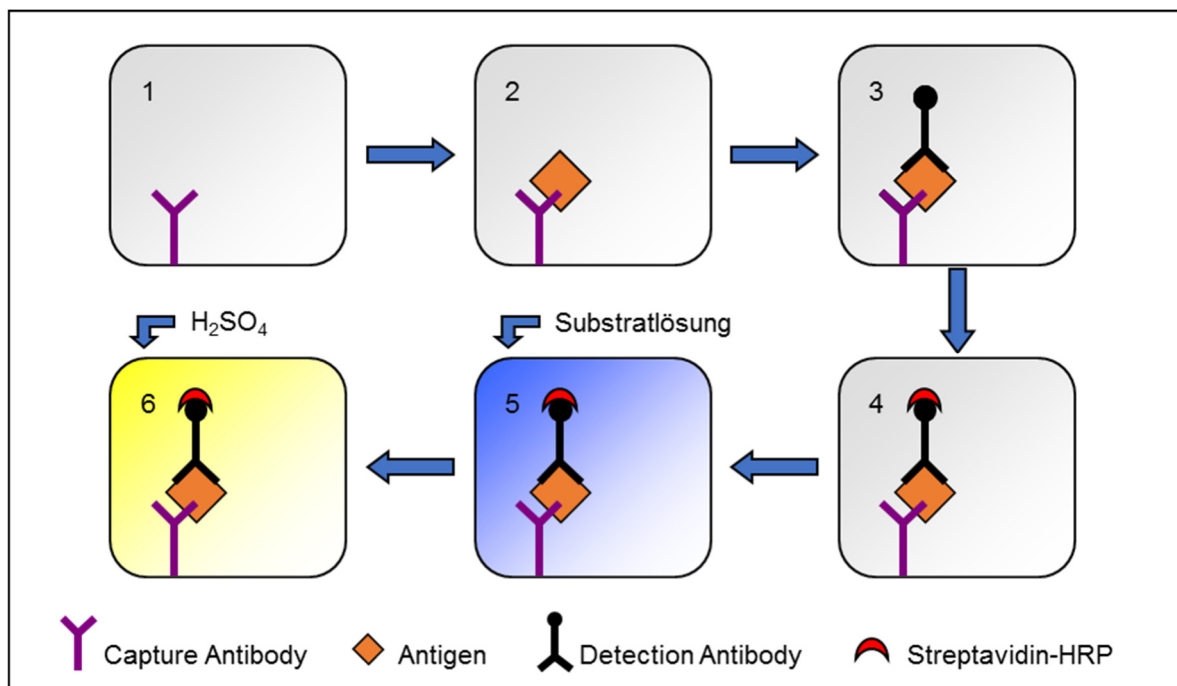
ELISA-KIT DUOSET für PD-L2 und PD-1	[R&D SYSTEMS, Wiesbaden, DE]
Entwickler	[R&D SYSTEMS, Wiesbaden, DE]
Color Reagent A: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Color Reagent B: Tetramethylbenzidin	
Bovines Serumalbumin (BSA)	[SIGMA, Deisenhofen, DE]
Tween 20	[MERCK-SCHUCHHARDT, Hohenbrunn, DE]

### Lösungen:

10 x PBS:	NaCl	80,0 g
	KCl	2,0 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	14,4 g
	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 1000 ml
	pH	7,3
Bindungspuffer:	1 x PBS, pH 7,3	
Waschpuffer:	1 x PBS + 0,05% Tween 20 (v/v)	
Blockpuffer:	1 x PBS + 2% BSA (w/v)	
Substratlösung:	Color Reagent A + Color Reagent B (im Verhältnis 1:1)	
Stopp-Lösung:	2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	

**Methode:**

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist aktuell der am häufigsten angewendete quantitative Immunassay. Seine Anfänge reichen bis in die frühen 1970er-Jahre zurück, in denen der ELISA parallel von zwei Arbeitsgruppen in Frankreich (Avrameas und Guilbert, 1971) und Schweden (Engvall und Perlmann, 1971) beschrieben wurde (Luttmann et al. 2014). In dieser Arbeit wurde die ELISA-Methode dazu verwendet eine quantitative Bestimmung von löslichem PD-L1, PD-L2 und PD-1 im Probandenserum durchzuführen.



**Abb. 2-3: Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips.**

Wie in Abb. 2-3 schematisch dargestellt wird ein Fängerantikörper (Capture Antibody) an eine Mikrotiterplatte aus Polystyrol gebunden (1). Nachdem die Probe mit dem zu untersuchenden Protein (Antigen) zugegeben wurde, bindet der Fängerantikörper dieses (2). Nun wird ein biotinylierter Sekundärantikörper (Detection Antibody), welcher mit seiner Bindungsstelle den Antigen-Antikörper-Komplex bindet, hinzugefügt (3). Durch das an den Sekundärantikörper gebundene Biotin wird das nun dazukommende Enzym Streptavidin-Peroxidase fixiert (4). Das Enzym katalysiert eine Redoxreaktion mit Oxidation von Tetramethylbenzidin und Reduktion von Wasserstoffperoxid, was einen bläulich sichtbaren Farbumschlag bewirkt (5). Die Zugabe von Schwefelsäure als Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag in den gelblichen Bereich (6), welcher in seiner Intensität photometrisch bestimmt werden kann und mit der Menge des gebundenen Zielmoleküls proportional ist.

Anhand einer Verdünnungsreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen kann die Konzentration des nachzuweisenden Antigens bestimmt werden.

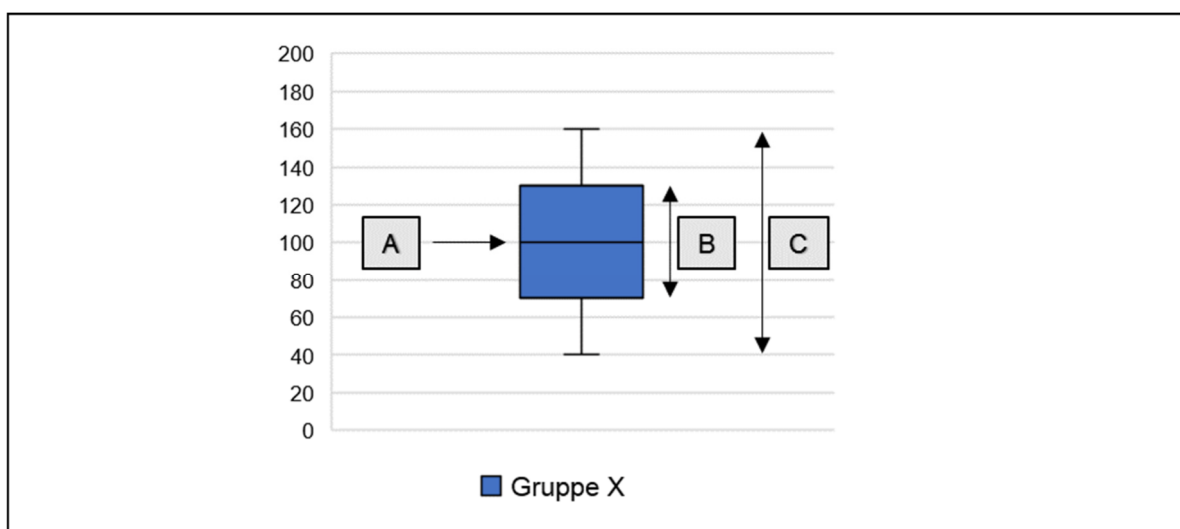
**Durchführung:**

Für die Bestimmung der PD-L2- und PD-1-Konzentrationen im Probandenserum wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatten mit jeweils 100 µl des Fängerantikörpers (1:100 verdünnt mit Bindungspuffer) bestückt und bei Raumtemperatur und Dunkelheit für 16 Stunden inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Um eine unspezifische Antigenbindung an freie Proteinbindestellen zu minimieren wurden die Kavitäten anschließend mit jeweils 300 µl Blockpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Weitere fünf Waschvorgänge mit Waschpuffer schlossen sich an. Danach wurden die Standards und Proben, die zuvor im Verhältnis 2:1 mit PBS verdünnt wurden, aufgetragen. Anschließend fand eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln auf dem Belly Dancer statt, woraufhin 5 weitere Waschschrte folgten. Nun wurden jeweils 100 µl der zuvor im Verhältnis 1:100 mit Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörperlösung zugegeben, woraufhin eine weitere zweistündige Inkubation unter leichtem Schütteln und bei Raumtemperatur folgte. Ungebundene Sekundärantikörper wurden durch 5 Waschschrte mit Waschpuffer aus den Kavitäten entfernt. Als nächstes wurden die Mikrotiterplatten für 20 Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit mit dem Streptavidin-HRP-Konjugat (1:200 in Blockpuffer; 100 µl/Kavität) inkubiert. Es schloss sich eine weitere Waschserie aus fünf Waschschrten an. Nun konnten 100 µl der Substratlösung zu jedem Ansatz gegeben werden, wodurch die enzymatische Nachweisreaktion in Gang gesetzt wurde. Hierbei wurde die Platte bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Sobald ein blauer Farbumschlag bei den Negativkontrollen sichtbar wurde, erfolgte die Zugabe von Schwefelsäure zum Abstoppen der Reaktion. Im Anschluss erfolgte die sofortige Messung der optischen Dichte der einzelnen Ansätze mit dem ANTHOS HT3 Reader bei 450 nm Wellenlänge und als Referenz bei 620 nm Wellenlänge. Die optischen Dichten wurden in die entsprechenden Antigenkonzentrationen mit dem Programm WinRead 2.3 umgerechnet.

Die PD-L1-Konzentration im Probandenserum wurde mit Hilfe des kommerziell gefertigten ELISA-Kits „Human programmed death-ligand 1 ELISA-Kit“ (MyBioSource, San Diego, US) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt.

## 2.8 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurde die Statistik-Software „SPSS 12.0“ (Chicago, Illinois, US) verwendet. Korrelationen wurden mittels Spearman-Rangkorrelationskoeffizient dargestellt. Der Vergleich beider Probandengruppen erfolgte mit dem nonparametrischen Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde in allen Fällen auf  $p < 0,05$  festgesetzt. Die Darstellung der Daten erfolgte hauptsächlich mit Hilfe von Box-Plots, die den Median in Form eines Querbalkens und den Interquartilsabstand als Box abbilden (Abb. 2-4). Ausreißer und Extremwerte wurden nicht berücksichtigt.



**Abb. 2-4: Beispiel eines typischen Boxplot-Diagramms.**

A: Median

B: Interquartilsabstand (IQA)

C: Bereich der Werte, die < 1,5 IQA vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind



### **3 Resultate**

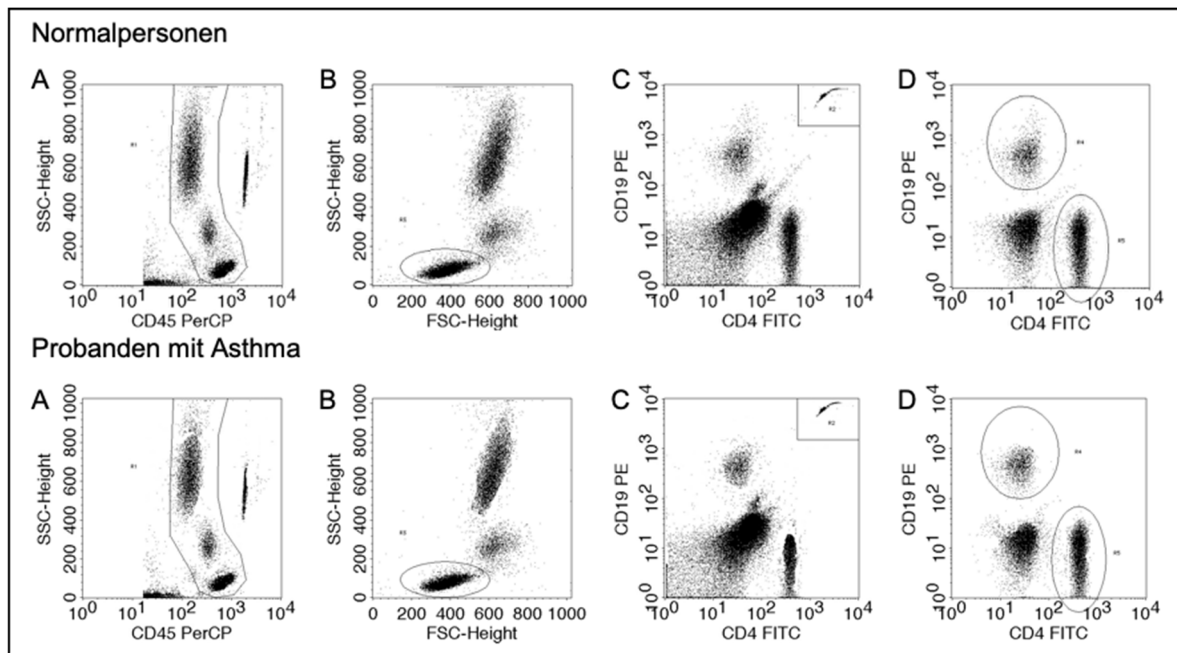
In dieser Studie wurden unterschiedliche Zellpopulationen im peripheren Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit leichtem allergischem Asthma bronchiale quantitativ bestimmt. Weiterhin wurde die Zytokinexpression von T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen sowie die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen durch mDCs und pDCs untersucht. Um das Ausmaß einer unspezifischen Bindung der verwendeten spezifischen Testantikörper abschätzen zu können wurde je ein Ansatz mit Isotypkontrollantikörpern, die kein humanes Antigen erkennen können, inkubiert. Bei allen Probanden zeigte weniger als 1% der jeweils registrierten Zellpopulation eine Färbung durch die Kontrollantikörper.

#### **3.1 Identifikation unterschiedlicher Zellpopulationen im peripheren Vollblut von Probanden mit Asthma und Normalpersonen**

##### **3.1.1 Identifikation von Leukozyten, B-Zellen, T-Helferzellen, mDCs und pDCs**

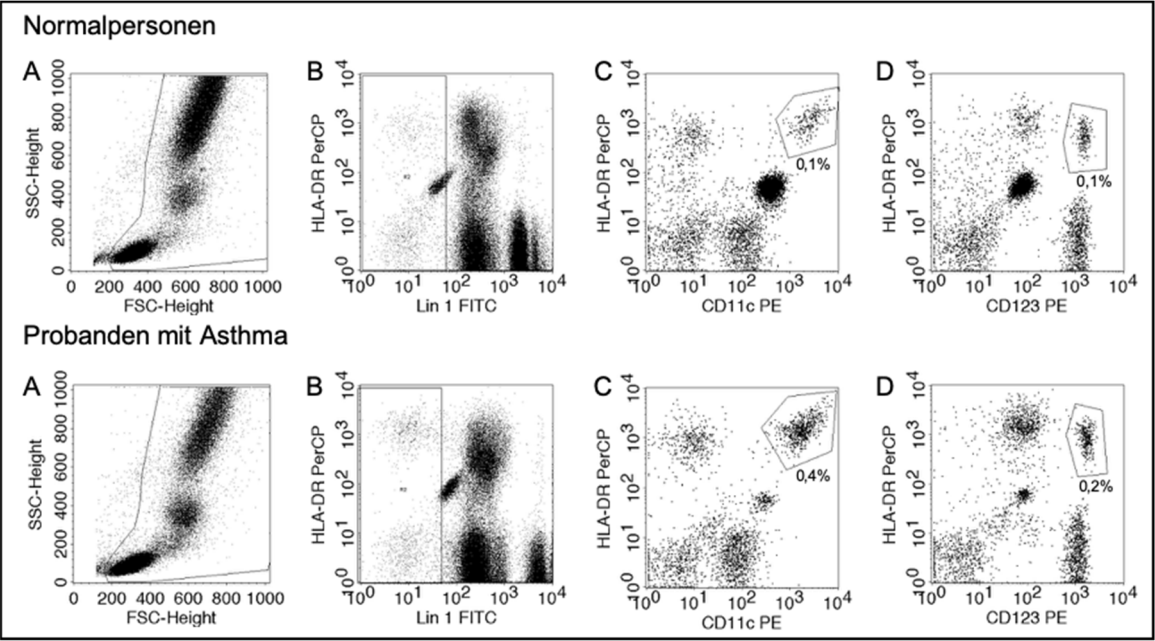
Mit Hilfe eines 4-Farben-Durchflusszytometers wurden die Leukozyten als CD45<sup>+</sup>, die B-Zellen als CD45<sup>+</sup> CD 19<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>, die T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) als CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>, die mDCs als Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> und die pDCs als Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup>, identifiziert (Abb. 3-1, Abb. 3-2).

Der Vergleich der absoluten Zellzahl der B-Zellen und der T-Helferzellen im peripheren Blut von Probanden mit Asthma und Normalpersonen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Dagegen fiel beim Vergleich der absoluten Zellzahl von mDCs und pDCs ein signifikanter Unterschied zwischen den Probanden mit Asthma und der Kontrollgruppe auf. So waren im Blut der Probanden mit Asthma, im Gegensatz zu den Normalpersonen, deutlich weniger mDCs nachweisbar (Median: NP: 18/μl vs. A: 12/μl; p=0,049). Auch pDCs kamen statistisch signifikant seltener im Blut der Probanden mit Asthma vor (Median: NP: 12/μl vs. A: 9/μl; p=0,033) (Tab. 3-1).



**Abb. 3-1: Gating-Strategie zur Identifikation von Leukozyten, B-Zellen und T-Helferzellen aus dem Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Vollblutproben wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbehandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert: Als erstes wurden die Leukozyten im SSC-CD45-Plot mit einem Gate eingegrenzt (A). Im SCC-FSC-Plot wurden die Lymphozyten markiert (B). Anschließend wurden die beads im CD19-CD4-Plot eingegrenzt (C). B-Zellen wurden schließlich als CD45<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> und T-Helferzellen als CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> identifiziert (D). Die Quantifizierung der Zellpopulationen konnte aufgrund der bekannten Anzahl an beads pro TruCount-Röhrchen erfolgen.



**Abb. 3-2: Gating-Strategie zur Identifikation der mDCs und pDCs aus dem Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Vollblutproben wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbehandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert: Als erstes wurden alle Zellen im SSC-FSC-Plot mit einem Gate eingegrenzt (A). Danach wurden die Zellen, die für die Lineage Marker negativ waren, markiert (B). Unter diesen Zellen wurden dann zum einen Zellen mit hoher Expression von HLA-DR und CD11c als mDCs (C) und zum anderen Zellen mit hoher Expression von HLA-DR und CD123 als pDCs identifiziert (D). Dargestellt ist außerdem der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den Leukozyten.

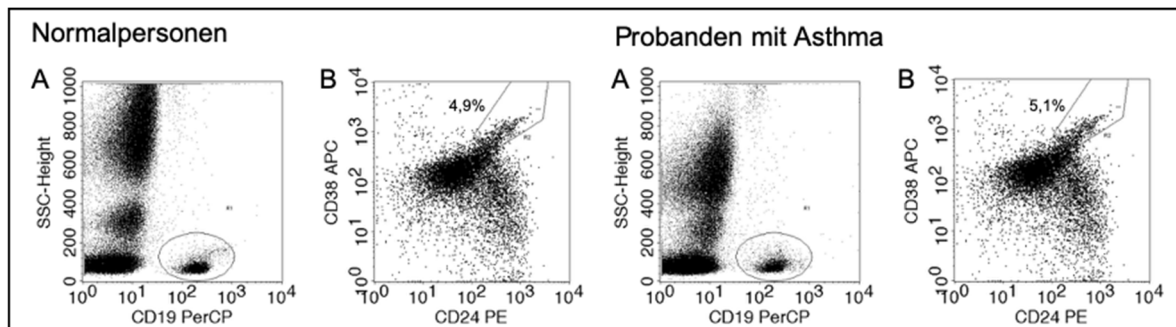
**Tab. 3-1: Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen im peripheren Vollblut.**

Dargestellt ist der Median und die Spannweite. Die Berechnung von Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests, wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurde (grau unterlegte Darstellung).

Zellpopulationen	Normalpersonen (Zellen/ $\mu$ l)	Probanden mit Asthma (Zellen/ $\mu$ l)
Leukozyten	6344 (4753-9286)	5499 (4368-10439)
B-Zellen	296 (87-407)	227 (143-498)
T-Helferzellen	1147 (759-1871)	861 (448-1792)
mDCs	18 (6-29)	12 (6-26)
pDCs	12 (6-27)	9 (4-21)

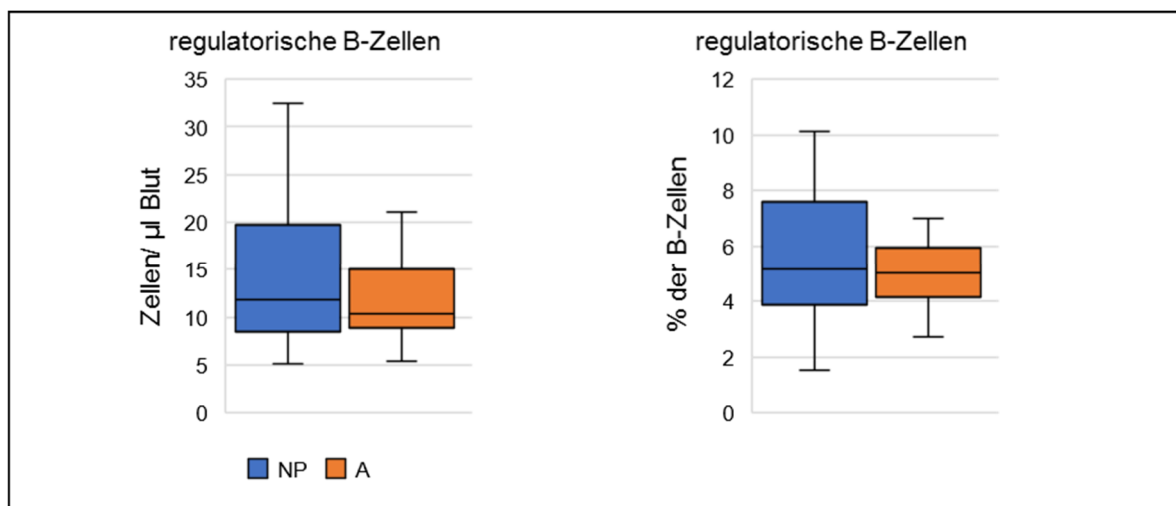
### 3.1.2 Identifikation regulatorischer B-Zellen

Die regulatorischen B-Zellen sind eine Subpopulation der B-Zellen und wurden in dieser Arbeit als  $CD19^+ CD24^{hi} CD38^{hi}$  identifiziert (Abb. 3-3). Weder für die absolute Zellzahl regulatorischer B-Zellen, noch für den prozentualen Anteil regulatorischer B-Zellen an allen B-Zellen ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Normalpersonen und Probanden mit Asthma (Abb. 3-4).



**Abb. 3-3: Gating-Strategie zur Identifikation regulatorischer B-Zellen aus dem Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Vollblutproben wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbehandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert: Als erstes wurden die B-Zellen im SSC-CD19-PerCP-Plot eingegrenzt (A). Unter diesen Zellen wurden dann die Zellen mit hoher Expression von CD38 und CD24 als regulatorische B-Zellen identifiziert (B). Dargestellt ist außerdem der prozentuale Anteil der regulatorischen B-Zellen an den B-Zellen.



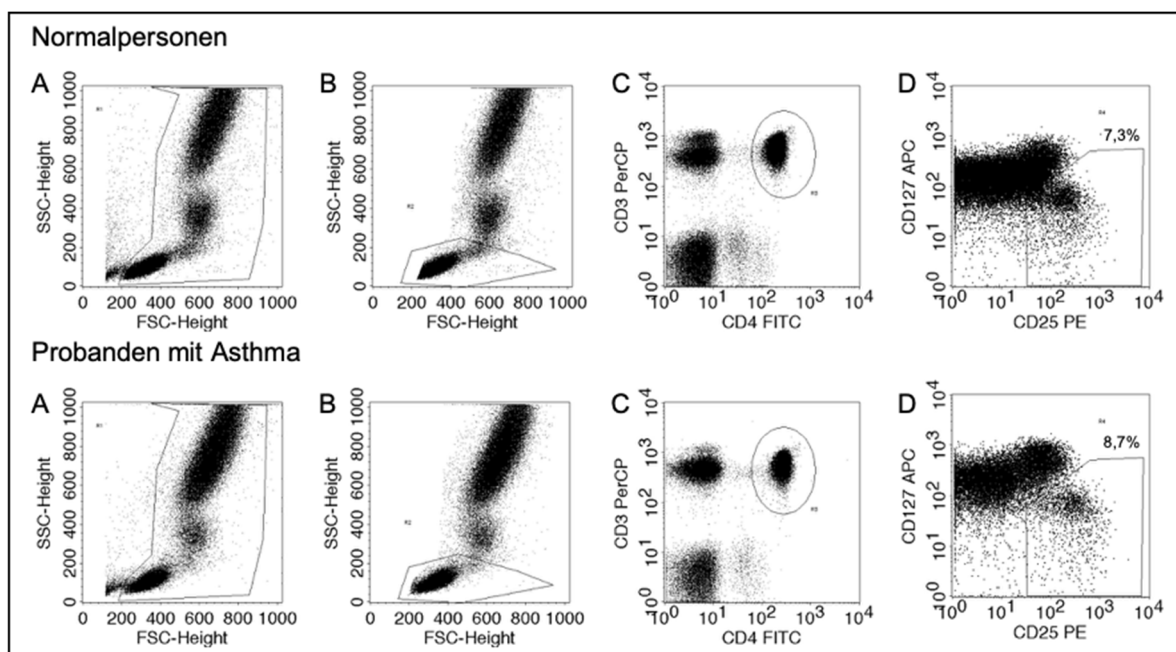
**Abb. 3-4: Regulatorische B-Zellen im peripheren Vollblut.**

Die Boxplots zeigen die absolute Zellzahl regulatorischer B-Zellen und den prozentualen Anteil regulatorischer B-Zellen an der Gesamtheit der B-Zellen im peripheren Vollblut. NP: Normalpersonen; A: Probanden mit Asthma

### 3.1.3 Identifikation regulatorischer T-Zellen

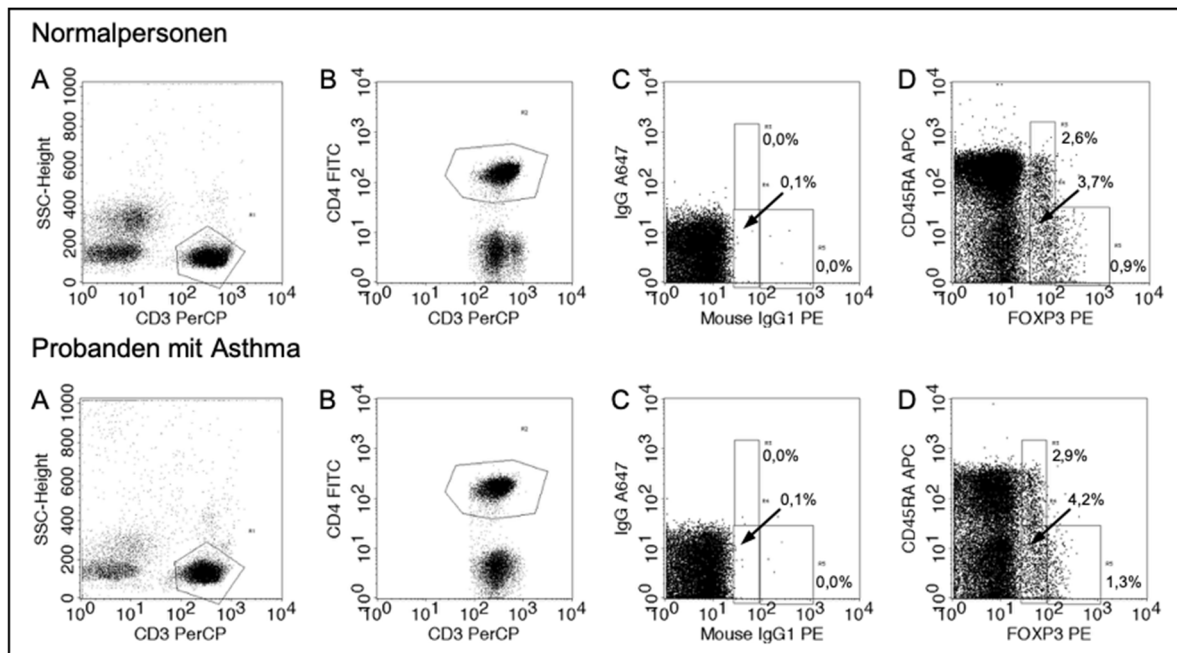
Auch die regulatorischen T-Zellen (regulatory T cells; Tregs) können den T-Helferzellen zugeordnet werden. Tregs wurden als  $CD3^+ CD4^+ CD25^{hi} CD127^{lo}$ , rTregs (resting Tregs) als  $CD3^+ CD4^+ FoxP3^{lo} CD45RA^+$ , aTregs (activated Tregs) als  $CD3^+ CD4^+ FoxP3^{hi} CD45RA^-$  und non-Tregs (non-suppressive Tregs) als  $CD3^+ CD4^+ FoxP3^{lo} CD45RA^-$  identifiziert (Abb. 3-5, Abb. 3-6).

Beim Vergleich der absoluten Zellzahlen der genannten Zellpopulationen zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen Normalpersonen und Probanden mit Asthma. Der prozentuale Anteil der rTregs und der aTregs an allen T-Helferzellen zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Statistisch signifikante Werte ergaben sich jedoch zwischen den beiden Gruppen beim Vergleich des prozentualen Anteils von Tregs und non-Tregs an allen T-Helferzellen. Hierbei zeigten Probanden mit Asthma einen höheren prozentualen Anteil an Tregs (Median: NP: 7,4% vs. A: 8,5%;  $p=0,001$ ) und non-Tregs (Median: NP: 3,6% vs. A: 4,2%;  $p=0,005$ ) (Abb. 3-7).



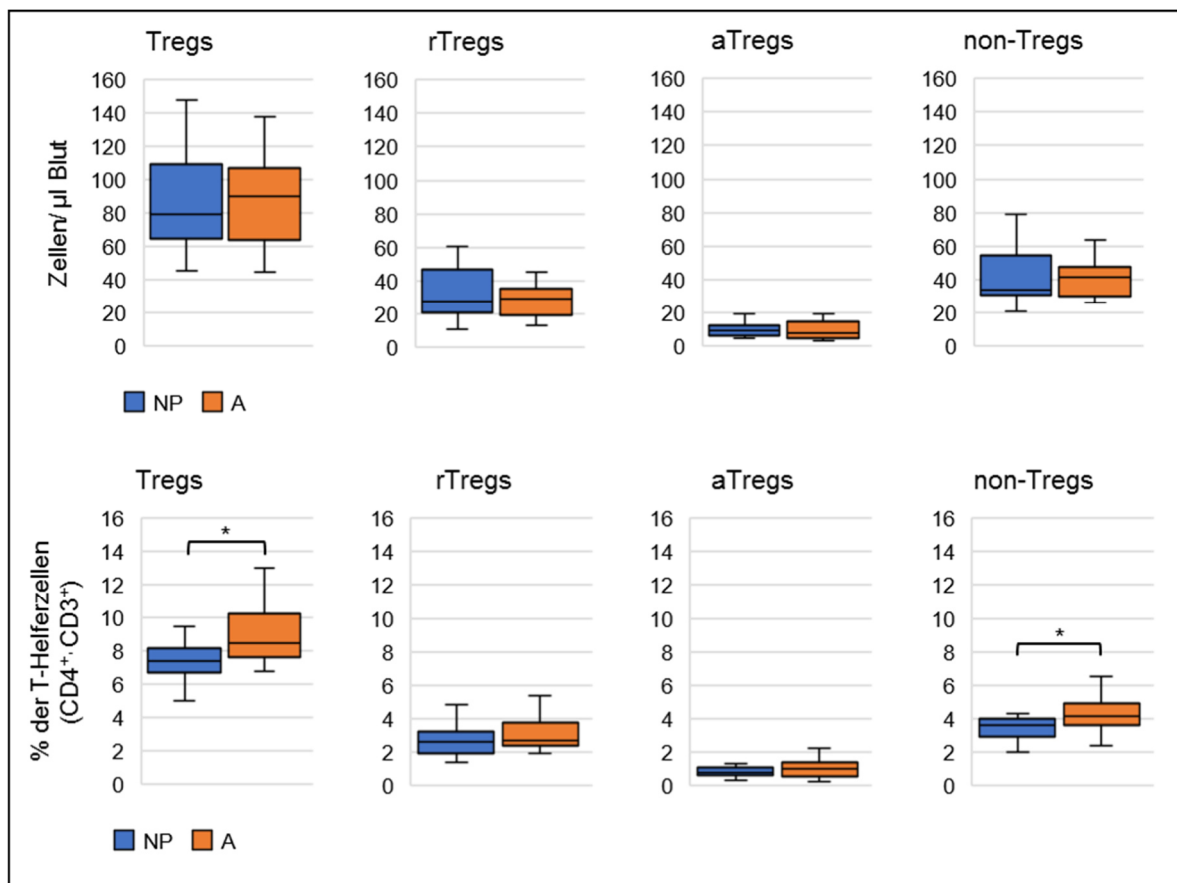
**Abb. 3-5: Gating-Strategie zur Identifikation von Tregs aus dem Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Vollblutproben wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, vorbehandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert: Als erstes wurden alle Zellen im SSC-FSC-Plot mit einem Gate eingegrenzt, um sie vom Zelldetritus zu trennen (A). Danach wurden die Lymphozyten im SSC-FSC-Plot markiert (B). Unter diesen Zellen wurden dann die Zellen mit hoher Expression von CD3 und CD4 als T-Helferzellen identifiziert (C). Zellen mit niedriger Expression von CD127 und hoher Expression von CD25 wurden anschließend als Tregs identifiziert (D). Dargestellt ist außerdem der prozentuale Anteil der Tregs an den T-Helferzellen.



**Abb. 3-6: Gating-Strategie zur Identifikation von rTregs, aTregs und non-Tregs aus isolierten PBMCs von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Isolierte PBMCs wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbehandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert: Die T-Zellen wurden in einem SSC-CD3-Plot markiert (A). Unter diesen Zellen wurden dann die Zellen mit hoher Expression von CD3 und CD4 als T-Helferzellen identifiziert (B). Um das Ausmaß an Hintergrundsignal durch unspezifische Bindung der Testantikörper an Zellen und Zelltrümmer abschätzen zu können wurde eine Isotypenkontrolle mit unspezifischen IgG-Antikörpern durchgeführt (C). Zellen mit niedriger Expression von FoxP3 und vorhandener Expression von CD45RA wurden als rTregs, Zellen mit hoher Expression von FoxP3 und keiner Expression von CD45RA wurden als aTregs und Zellen mit niedriger Expression von FoxP3 und keiner Expression von CD45RA als non-Tregs, identifiziert. Dargestellt ist außerdem der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den T-Helferzellen.



**Abb. 3-7: Regulatorische T-Zellen im peripheren Vollblut.**

Die Boxplots zeigen die absolute Zellzahl der Tregs, rTregs, aTregs und non-Tregs im peripheren Vollblut. Weiterhin ist deren prozentualer Anteil an der T-Helferzellpopulation dargestellt. Die Berechnung von Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests, wobei  $p < 0,05$  (\*) als statistisch signifikant gewertet wurde. NP: Normalpersonen; A: Probanden mit Asthma

### 3.2 Zytokinexpression in T-Helferzellen

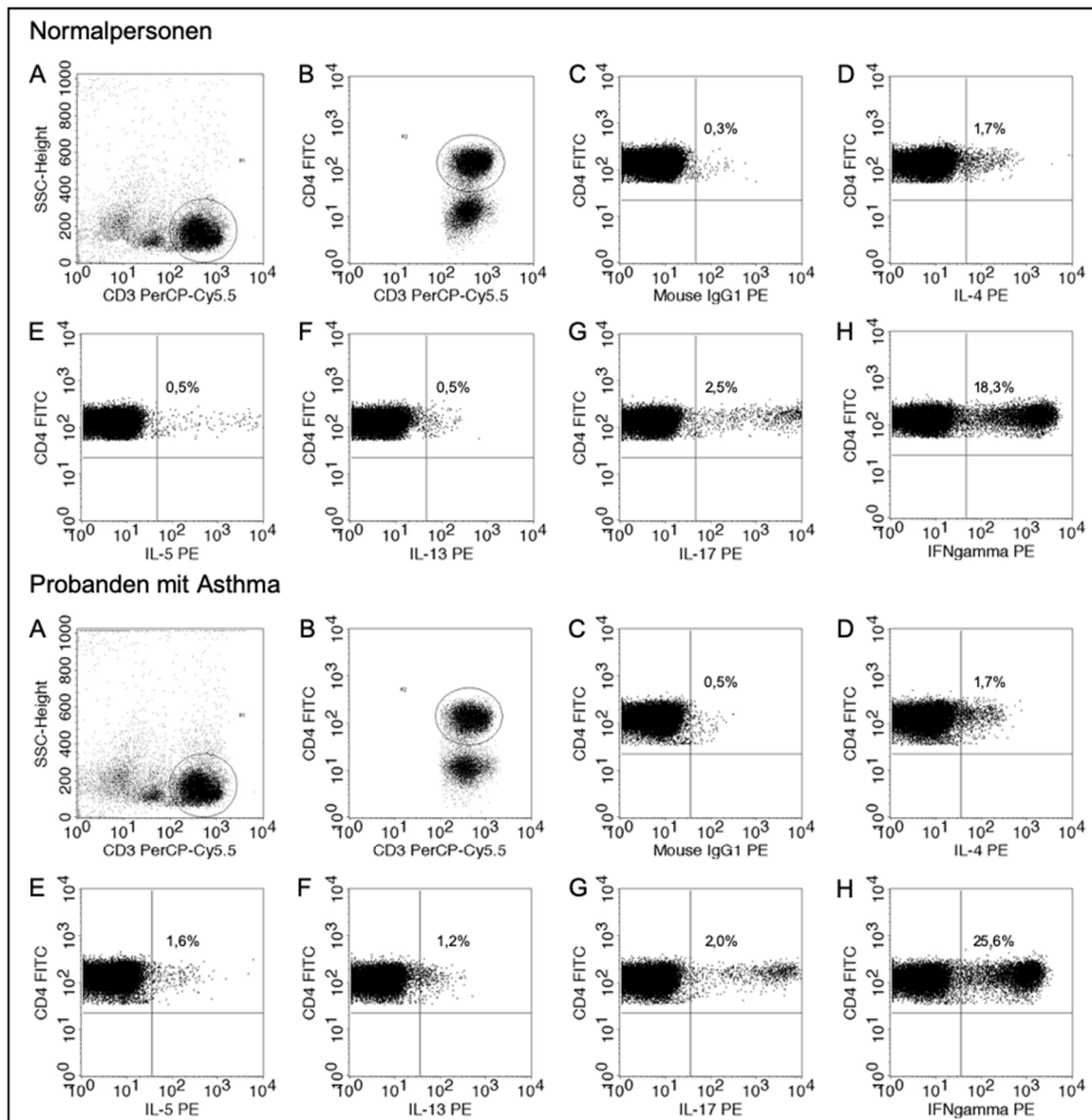
T-Helferzellen können anhand ihrer charakteristischen Zytokinexpression im Allgemeinen in die Subpopulationen Typ1-, Typ2- und Typ17-T-Helferzellen unterteilt werden. Hierfür wurden T-Helferzellen mittels Ionomycin und PMA zur Zytokinsynthese angeregt. Anschließend erfolgte eine Markierung der intrazellulären Zytokine mittels Antikörper gegen IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 und IFN- $\gamma$  woraufhin sich eine durchflusszytometrische Untersuchung anschloss (Abb. 3-8).

IFN- $\gamma$ , als typischer Marker für Typ1-T-Helferzellen, war in T-Helferzellen von Probanden mit Asthma (Median: 19,0%) und Normalpersonen (Median: 16,3%) nachweisbar, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 werden von Typ2-T-Helferzellen sezerniert und können für deren Identifikation herangezogen werden. Für IL-4 und IL-13 wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den T-Helferzellen der Probanden mit Asthma und der Kontrollgruppe gefunden. Die T-Helferzellen der Probanden mit Asthma waren zu einem größeren Prozentsatz positiv für IL-4 (Median: NP: 1,6% vs. A: 2,1%;  $p=0,040$ ). Ebenso konnte IL-13 in den T-Helferzellen der Probanden mit Asthma signifikant häufiger nachgewiesen werden (Median: NP: 0,4% vs. A: 0,6%;  $p=0,040$ ). Für die Expression von IL-5 dagegen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

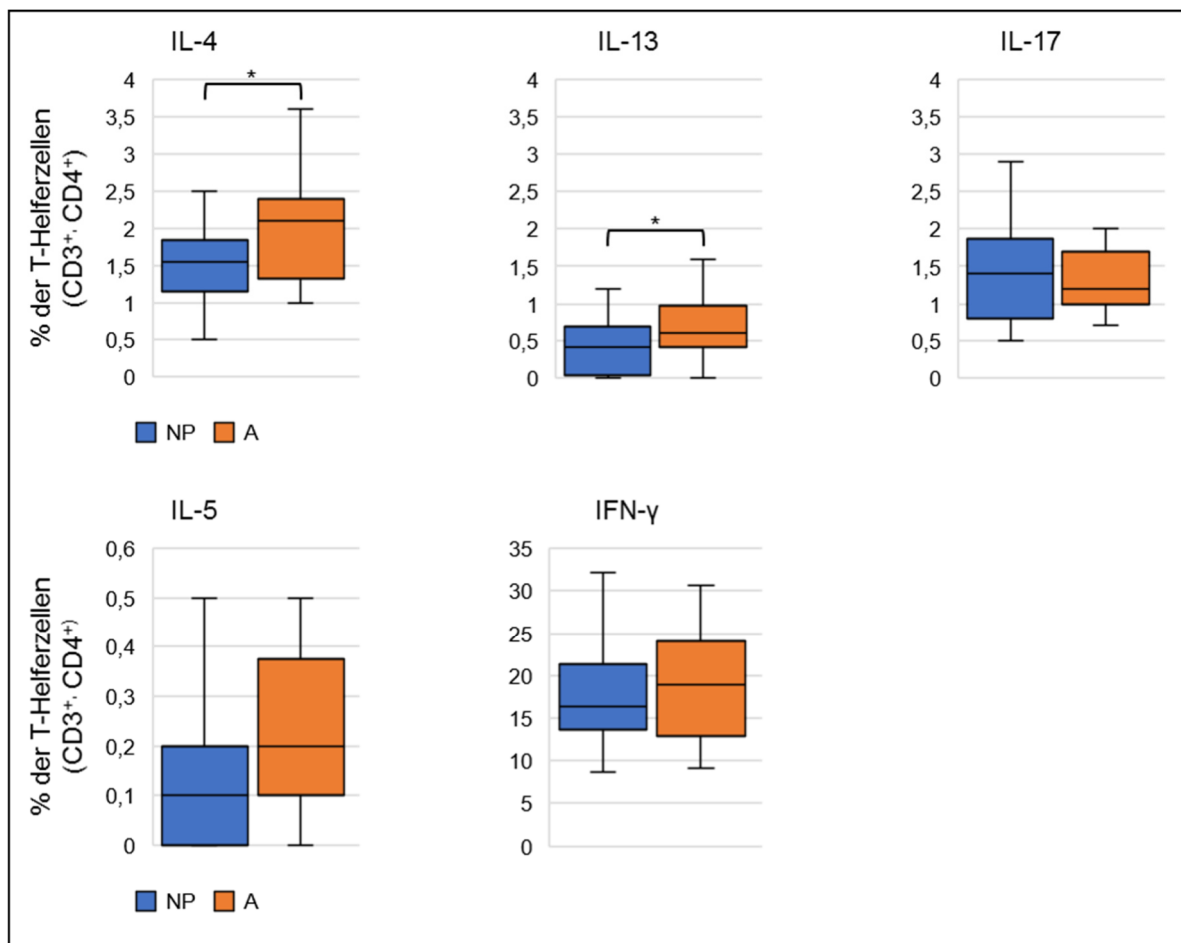
IL-17 kann zur Identifikation von Typ17-T-Helferzellen verwendet werden. Ein signifikanter Unterschied der IL-17-Expression durch T-Helferzellen von Probanden mit Asthma bzw. Normalpersonen konnte nicht nachgewiesen werden.





**Abb. 3-8: Gating-Strategie zur Beurteilung der Zytokinexpression in T-Helferzellen von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Isolierte PBMCs wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, vorbehandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert: Die T-Zellen wurden in einem SSC-CD3-Plot markiert (A). Unter diesen Zellen wurden dann die Zellen mit hoher Expression von CD3 und CD4 als T-Helferzellen identifiziert (B). Eine Isotypenkontrolle mit unspezifischen IgG-Antikörpern wurde durchgeführt (C). Durch verschiedene Ansätze konnten dann die T-Helferzellen, die IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 und IFN- $\gamma$  exprimieren, quantifiziert werden (D bis H). Dargestellt ist außerdem der prozentuale Anteil der T-Helferzellen, der das jeweilige Zytokin exprimiert.



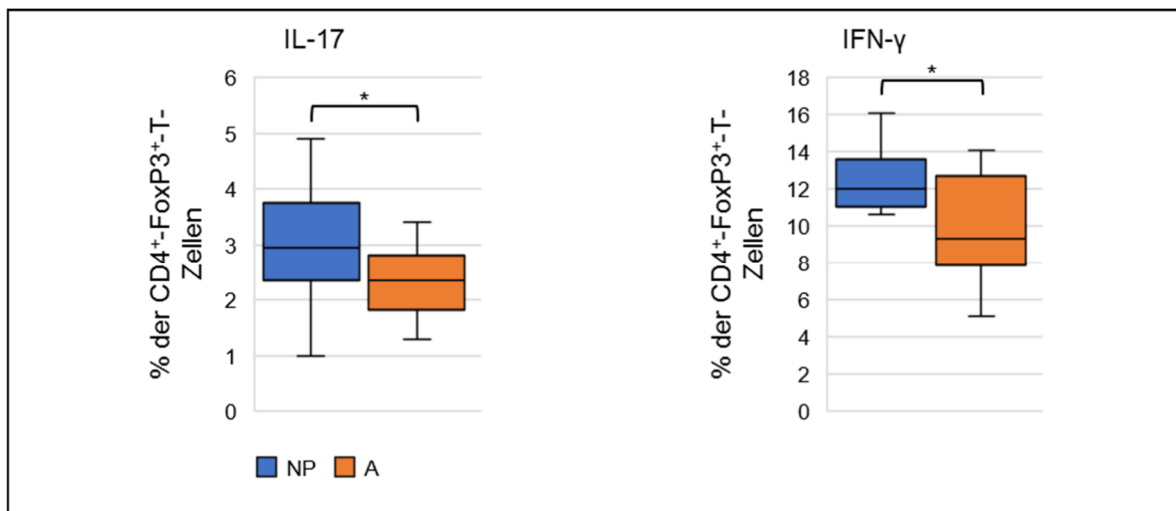
**Abb. 3-9: Zytokinexpression in T-Helferzellen.**

Die Boxplots zeigen den prozentualen Anteil IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 oder IFN-γ exprimierender T-Helferzellen gemessen an der Gesamtheit der T-Helferzellen. Die Berechnung von Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests, wobei  $p < 0,05$  (\*) als statistisch signifikant gewertet wurde. NP: Normalpersonen; A: Probanden mit Asthma

### 3.3 Zytokinexpression in regulatorischen T-Zellen

Untersucht wurde die Expression der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 und IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen. IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 konnte nur in einem sehr geringen Prozentsatz der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen gemessen werden, sodass eine valide statistische Auswertung der Daten nicht möglich war.

Der Vergleich der IL-17 Expression der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen der Probanden mit Asthma mit derer der Normalpersonen ergab einen statistisch signifikanten Unterschied. Ausgehend von der Gesamtpopulation der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen konnten bei Probanden mit Asthma prozentual weniger IL-17 exprimierende CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen identifiziert werden als bei den Normalpersonen (Median: NP: 3,0% vs. A: 2,4%,  $p=0,026$ ). Auch die Expression von IFN- $\gamma$  wurde statistisch signifikant seltener bei CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen von Probanden mit Asthma beobachtet (Median: NP: 12,0% vs. A: 9,3%;  $p=0,005$ ) (Abb. 3-10).



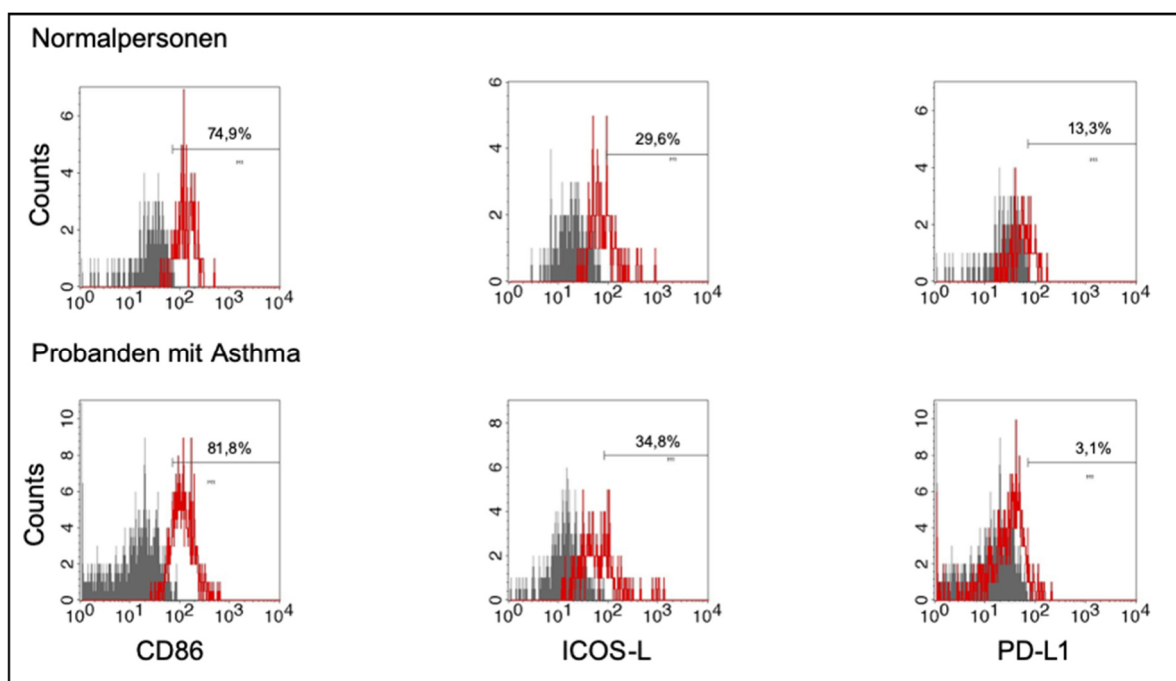
**Abb. 3-10: Zytokinexpression in CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen.**

Die Boxplots zeigen den prozentualen Anteil IL-17 oder IFN- $\gamma$  exprimierender CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen gemessen an der Gesamtheit der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen. Die Berechnung von Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests, wobei  $p < 0,05$  (\*) als statistisch signifikant gewertet wurde. NP: Normalpersonen; A: Probanden mit Asthma

### 3.4 Expression von Oberflächenmolekülen auf mDCs

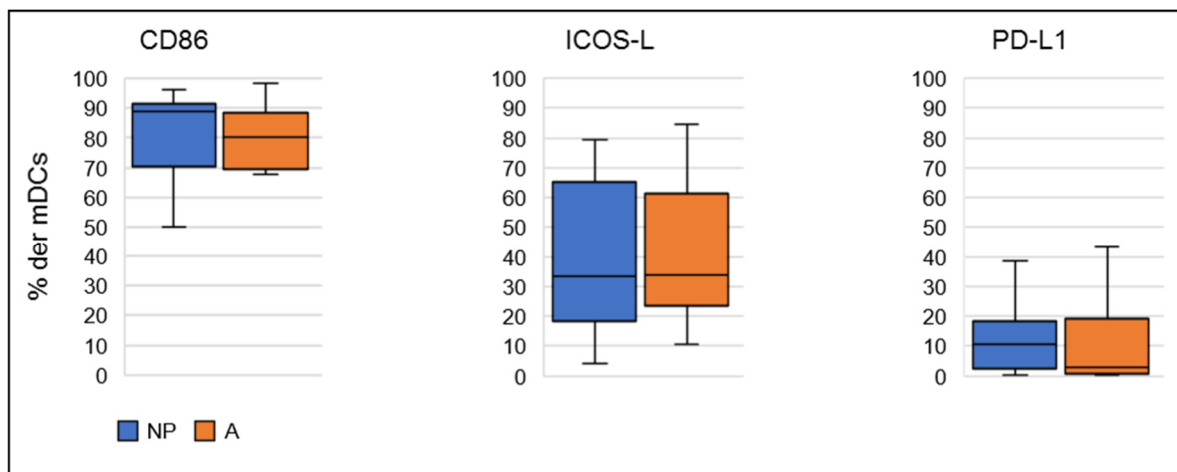
MDCs von Normalpersonen und Probanden mit Asthma wurden vergleichend auf die Expression der T-Zell-kostimulatorischen bzw. T-Zell-koinhibitorischen Liganden CD86, ICOS-L und PD-L1 untersucht. Hierfür wurden Vollblutproben mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert woran sich eine durchflusszytometrische Messung anschloss (Abb. 3-11).

CD86 wurde auf mDCs von Probanden mit Asthma (Median: 80,0%) und Normalpersonen (Median: 88,7%) nachgewiesen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen war. Auch PD-L1 konnte auf mDCs beider Gruppen nachgewiesen werden (Median: NP: 10,4% vs. A: 3,0%). Es ergab sich jedoch auch hier kein statistisch relevanter Unterschied. Für die Expression von ICOS-L auf mDCs ergab sich gleichfalls kein relevanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Median: NP: 33,6% vs. A: 33,9%, Abb. 3-12).



**Abb. 3-11: Exemplarische Darstellung von Histogrammen zur Beurteilung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf mDCs von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Vollblutproben wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, vorbehandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. mDCs wurden als Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> identifiziert. Die Histogrammplots stellen exemplarisch die Expression der Oberflächenmoleküle auf mDCs eines Probanden dar. Dargestellt ist außerdem der prozentuale Anteil der mDCs, der das jeweilige Oberflächenmolekül exprimiert. Grau: Isotypenkontrolle mittels unspezifischer IgG-Antikörper; rot: Signal der spezifischen Antikörper



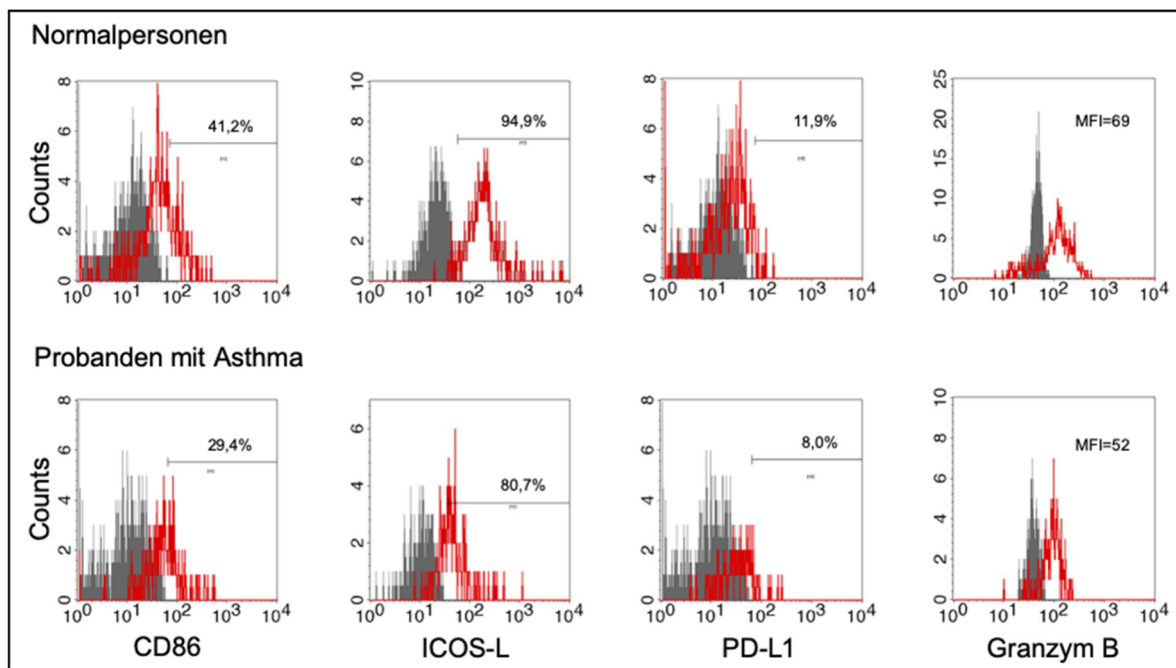
**Abb. 3-12: Expression von CD86, ICOS-L und PD-L1 auf mDCs.**

Die Boxplots zeigen den prozentualen Anteil CD86, ICOS-L und PD-L1 exprimierender mDCs an allen mDCs im peripheren Vollblut. NP: Normalpersonen; A: Probanden mit Asthma

### 3.5 Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen auf bzw. in pDCs

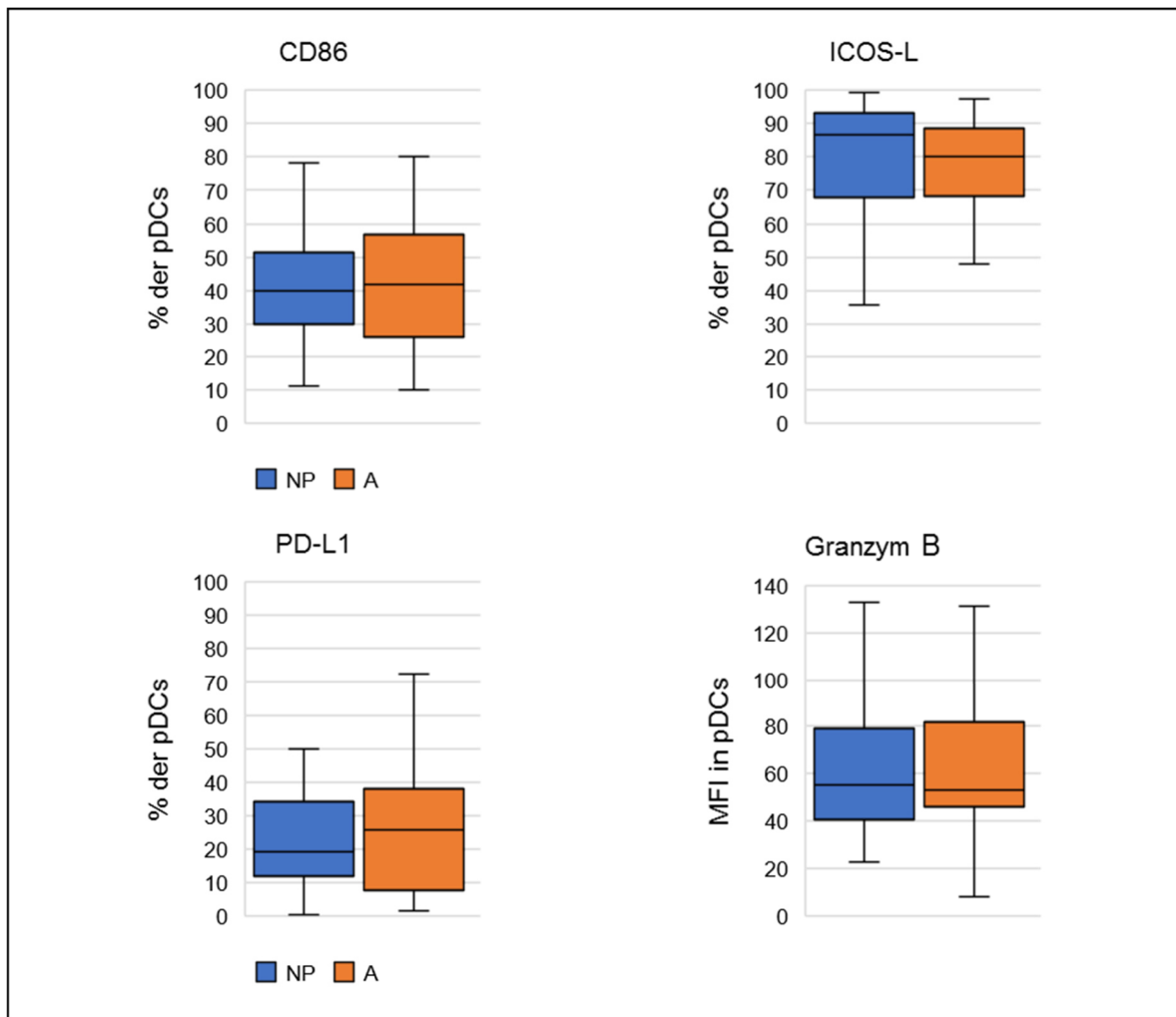
Untersucht wurde die Expression der T-Zell-kostimulatorischen bzw. T-Zell-koinhibitorischen Liganden CD86, ICOS-L und PD-L1 sowie der T-Zell-inhibitorischen intrazellulären spezifischen Serinprotease Granzym B auf bzw. in pDCs (Abb. 3-13).

Bezüglich des Oberflächenmoleküls CD86 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den pDCs der Normalpersonen (Median: 40,1%) und denen der Probanden mit Asthma (Median: 42,0%) festgestellt werden. ICOS-L wurde weniger auf pDCs von Probanden mit Asthma (Median: 80,0%) exprimiert als auf pDCs von Normalpersonen (Median: 86,5%). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand jedoch nicht. Auch für die Expression von PD-L1 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den pDCs der Normalpersonen (Median: 19,1%) und den pDCs der Probanden mit Asthma (Median: 25,7%) nachgewiesen werden. Nahezu alle pDCs waren positiv für Granzym B, weshalb für den Vergleich der beiden Gruppen die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) und nicht der prozentuale Anteil positiver pDCs herangezogen wurde. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der Granzym B Expression zwischen Normalpersonen (Median: 56) und Probanden mit Asthma (Median: 53) festgestellt werden (Abb. 3-14).



**Abb. 3-13: Exemplarische Darstellung von Histogrammen zur Beurteilung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und intrazellulärer Moleküle auf bzw. in pDCs von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Vollblutproben wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, vorbehandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. pDCs wurden als Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> identifiziert. Die Histogrammplots stellen exemplarisch die Expression der Antigene auf bzw. in pDCs eines Probanden dar. Dargestellt ist außerdem der prozentuale Anteil der mDCs, der das jeweilige Antigen exprimiert sowie für Granzym B die mediane Fluoreszenzintensität (MFI). Grau: Isotypenkontrolle mittels unspezifischer IgG-Antikörper; rot: Signal der spezifischen Antikörper



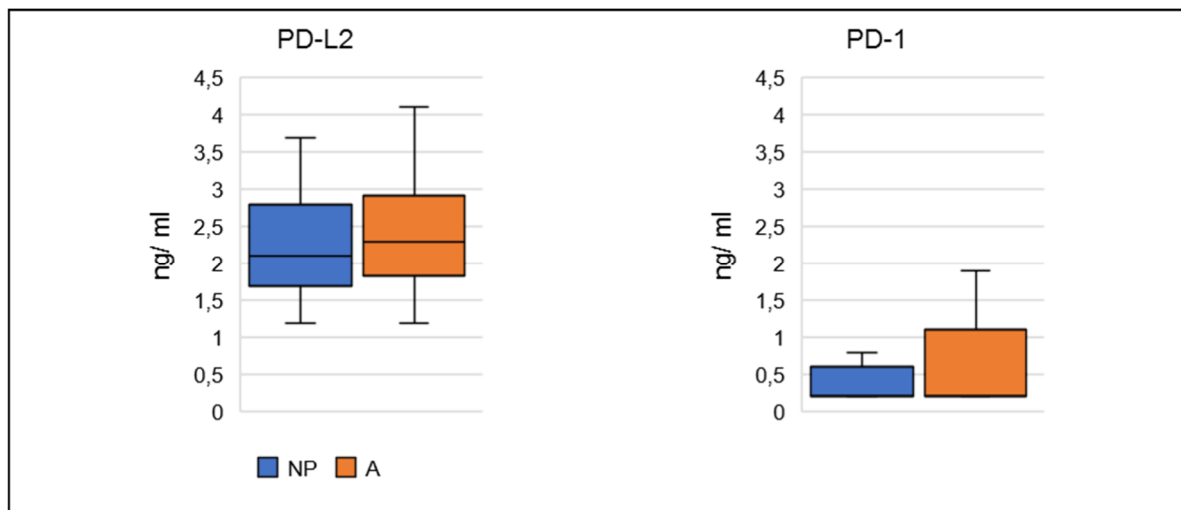
**Abb. 3-14: Expression von CD86, ICOS-L, PD-L1 und Granzym B auf bzw. in pDCs.**

Die Boxplots zeigen den prozentualen Anteil CD86, ICOS-L und PD-L1 exprimierender pDCs an allen pDCs im peripheren Vollblut und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von Granzym B in pDCs. NP: Normalpersonen; A: Probanden mit Asthma

### 3.6 Lösliches PD-L1, PD-L2 und PD-1 im Serum

Die löslichen Varianten der T-Zell-koinhibitorischen Liganden PD-L1 und PD-L2, sowie deren Rezeptor PD-1 wurden im Serum mittels ELISA untersucht.

PD-L1 war im Serum der Probanden beider Gruppen nicht nachweisbar ( $< 3,9$  pg/ml). PD-L2 dagegen konnte sowohl bei Probanden mit Asthma als auch bei Normalpersonen im Serum nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich nicht (Median: NP: 2,1 ng/ml vs. A: 2,3 ng/ml). Auch PD-1 war in geringer Menge bei Probanden mit Asthma und Normalpersonen im Serum vorhanden, jedoch zeigte sich auch hier kein statistisch relevanter Unterschied zwischen Probanden mit Asthma und der Kontrollgruppe (Median: NP: 0,2 ng/ml vs. A: 0,2 ng/ml) (Abb. 3-15).



**Abb. 3-15: Lösliches PD-L2 und PD-1 im Serum.**

Die Boxplots zeigen die Serumkonzentrationen von löslichem PD-L1 und PD-1 im peripheren Vollblut.

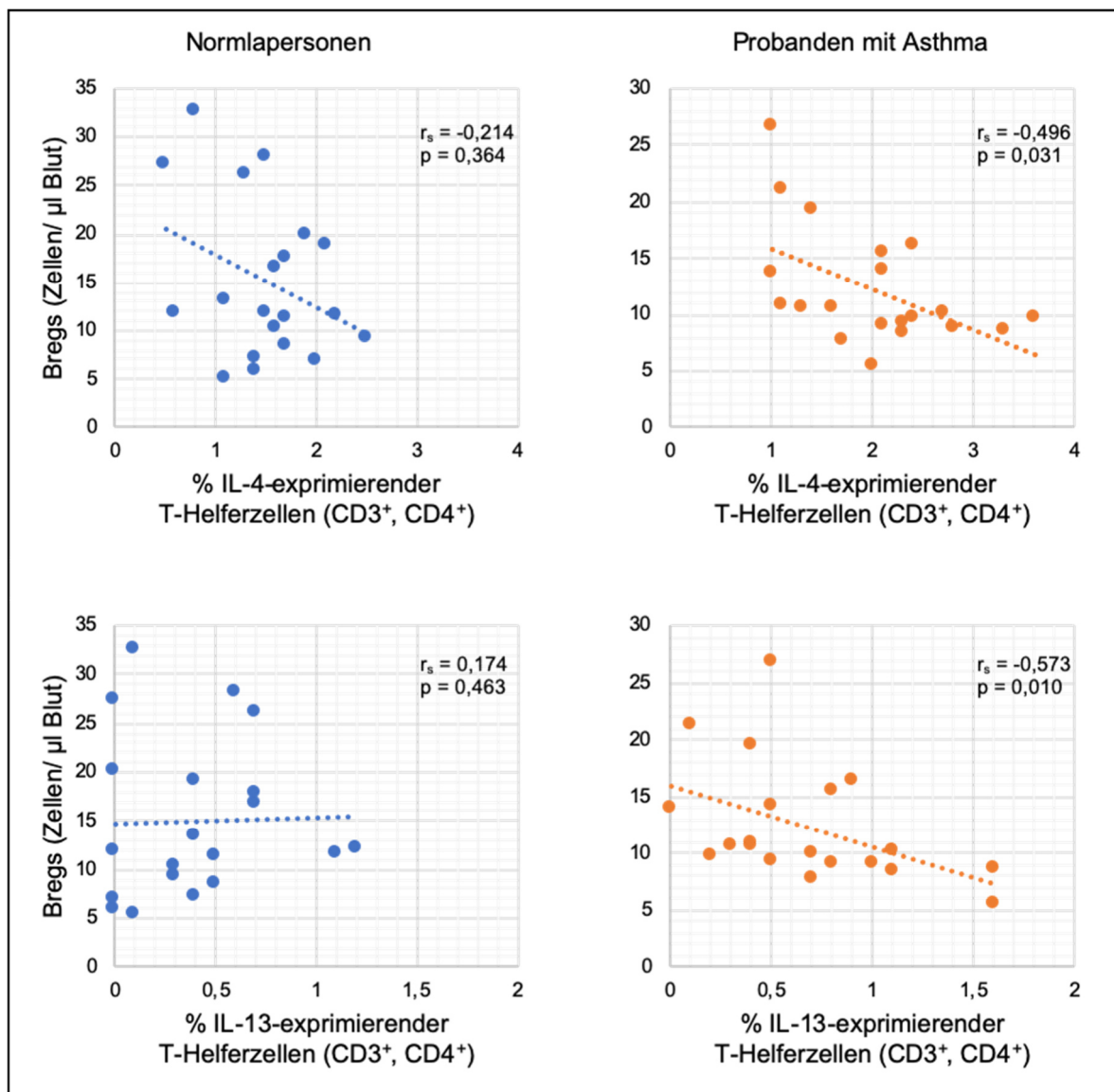
NP: Normalpersonen; A: Probanden mit Asthma

### 3.7 Korrelationen zwischen der Anzahl regulatorischer B-Zellen und der Zytokinexpression von T-Helferzellen im peripheren Vollblut

Die absolute Anzahl regulatorischer B-Zellen wurde mit dem prozentualen Anteil IL-4 bzw. IL-13 exprimierender T-Helferzellen im peripheren Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma korreliert.

Bei den Probanden ohne Asthma zeigten sich keine signifikanten Korrelationen. Dagegen konnte bei den Probanden mit Asthma eine signifikante negative Korrelation zwischen der Anzahl regulatorischer B-Zellen und dem prozentualen Anteil IL-4 und IL-13 exprimierender T-Helferzellen festgestellt werden (Abb. 3-16).





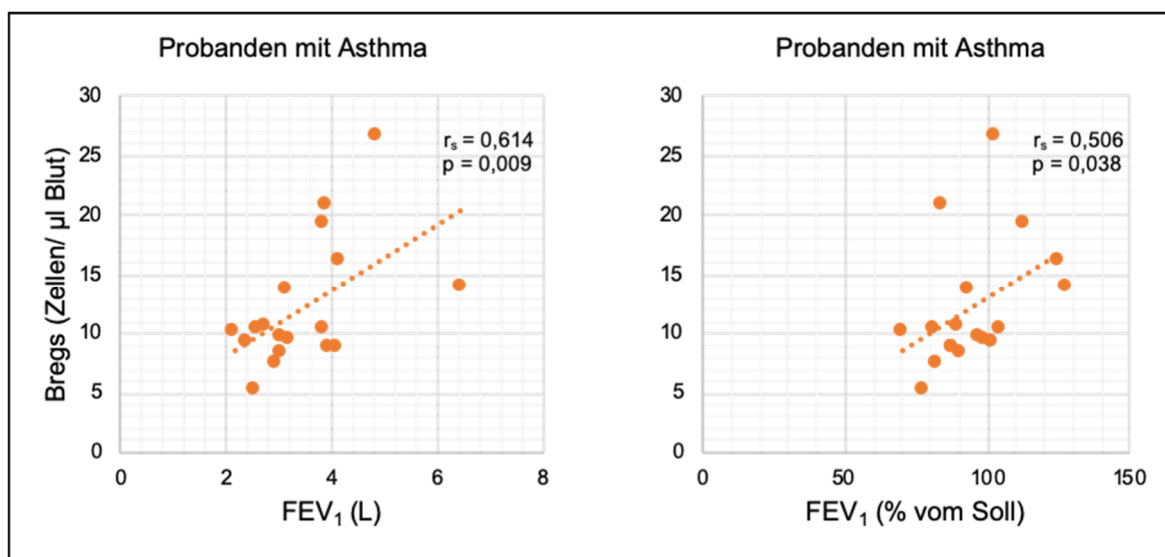
**Abb. 3-16: Korrelation zwischen der absoluten Anzahl regulatorischer B-Zellen und der prozentualen IL-4- bzw. IL-5-Expression der T-Helferzellen im peripheren Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Verwendung fand der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ( $r_s$ ), wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurde.

### 3.8 Korrelationen zwischen der Anzahl regulatorischer B-Zellen im peripheren Vollblut und der FEV<sub>1</sub> von Probanden mit Asthma

Untersucht wurde eine mögliche Korrelation zwischen der absoluten Anzahl regulatorischer B-Zellen im peripheren Vollblut und der FEV<sub>1</sub> in Absolutwerten [FEV<sub>1</sub> (L)] bzw. der FEV<sub>1</sub> als prozentualer Anteil des alters- und geschlechtsspezifischen Normwertes [FEV<sub>1</sub> (% vom Soll)].

Es zeigte sich, dass die absolute Anzahl regulatorischer B-Zellen sowohl mit der FEV<sub>1</sub> (L) als auch der FEV<sub>1</sub> (% vom Soll) signifikant positiv korreliert (Abb. 3-17).



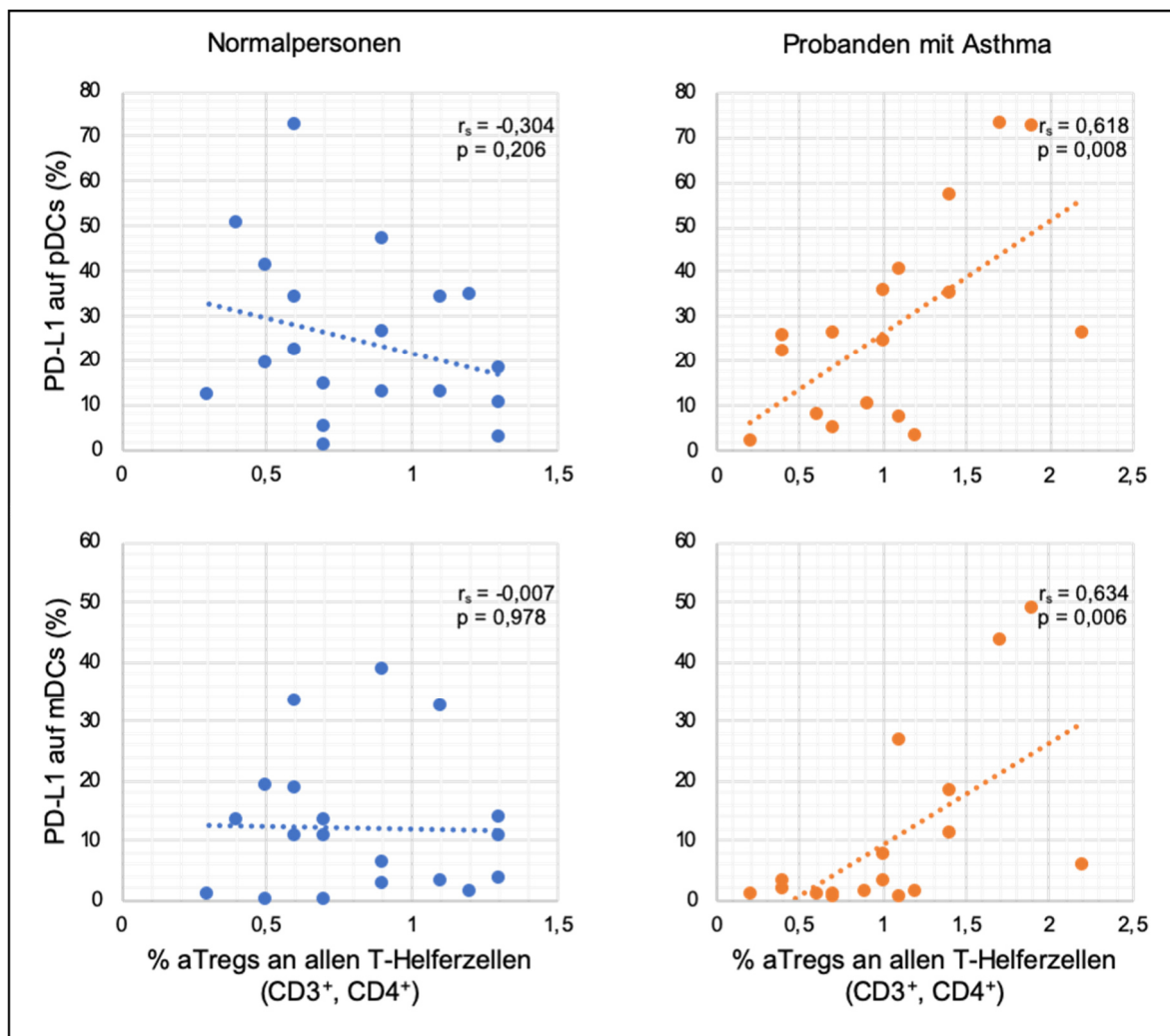
**Abb. 3-17: Korrelation zwischen der absoluten Anzahl regulatorischer B-Zellen im peripheren Vollblut und der FEV<sub>1</sub> (L) bzw. der FEV<sub>1</sub> (% vom Soll) bei Probanden mit Asthma.**

Verwendung fand der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ( $r_s$ ), wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurde.

### 3.9 Korrelationen zwischen der PD-L1-Expression auf dendritischen Zellen und dem prozentualen Anteil von aTregs an den T-Helferzellen

Die PD-L1-Expression auf mDCs und auf pDCs wurde mit dem prozentualen Anteil der aTregs (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>hi</sup> CD45RA<sup>-</sup>) an allen T-Helferzellen im peripheren Vollblut von Probanden mit Asthma und Normalpersonen korreliert.

Bei den Probanden ohne Asthma zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von PD-L1 auf mDCs bzw. pDCs und dem prozentualen Anteil der aTregs an den T-Helferzellen. Im Gegensatz dazu konnte bei Probanden mit Asthma eine signifikante positive Korrelation zwischen der PD-L1-Expression von mDCs bzw. pDCs und dem prozentualen Anteil der aTregs an den T-Helferzellen nachgewiesen werden (Abb. 3-18).



**Abb. 3-18: Korrelation zwischen der PD-L1-Expression auf mDCs bzw. pDCs und dem prozentualen Anteil der aTregs an allen T-Helferzellen im peripheren Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.**

Verwendung fand der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ( $r_s$ ), wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurde.

## 4 Diskussion

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege und gehört zu den häufigsten chronischen Erkrankungen überhaupt. Sowohl Kinder als auch Erwachsene zählen zu den weltweit über 300 Millionen Betroffenen. Da die zugrundeliegenden molekularen Abläufe bislang nur teilweise bekannt sind, ist die Erkrankung bis heute noch nicht heilbar, sondern nur therapierbar. Zur Immunpathogenese des Asthma bronchiale tragen eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen und Moleküle bei. Die Hauptsymptome der Erkrankung bestehen aus Episoden akuter Atemnot, einer reversiblen Obstruktion der Atemwege, einer bronchialen Hyperreagibilität und einer Entzündung der Atemwege (Global Asthma Network 2018; Ukena et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede zwischen immunregulatorischen Mechanismen und daran beteiligter Zellen und Moleküle bei Probanden mit allergischem Asthma bronchiale und einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Hierfür wurden bei beiden Probandenkollektiven verschiedene Zellpopulationen im peripheren Vollblut identifiziert. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf regulatorische B-Zellen, T-Helferzellen und verschiedene Subpopulationen regulatorischer T-Zellen, sowie auf mDCs und pDCs gelegt. In diesem Kontext wurde die Zytokinexpression von T-Helferzellen und von regulatorischen T-Zellen, wie auch die Expression T-Zell-kostimulatorischer und T-Zell-koinhibitorischer Moleküle durch mDCs und pDCs, evaluiert.

Das Probandenkollektiv der Asthmatiker bestand in dieser Arbeit ausschließlich aus Probanden mit leichtem allergischem Asthma ohne Therapie mit inhalativen Glukokortikoiden, um Ergebnisse nicht durch steroid-induzierte Mechanismen zu verfälschen.

### 4.1 T<sub>H</sub>2-Zytokine werden bei Probanden mit Asthma signifikant häufiger exprimiert als bei Normalpersonen

In dieser Arbeit zeigte sich nach Stimulation der Zytokinsynthese von T-Helferzellen mittels Ionomycin und PMA eine signifikant höhere Expression der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und IL-13 bei Probanden mit Asthma im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Auch das T<sub>H</sub>2-Zytokin IL-5 wurde stärker von den Probanden mit Asthma exprimiert; ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand hier jedoch nicht. Bei dem T<sub>H</sub>1-Zytokin IFN- $\gamma$  und dem T<sub>H</sub>17-Zytokin IL-17 ließen sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Sowohl bei Normalpersonen als auch bei Probanden mit Asthma wurden IFN- $\gamma$  und IL-17 aber durch T-Helferzellen exprimiert.

Die zentrale Rolle der Typ2-T-Helferzellen und ihrer Zytokine in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale ist mittlerweile unumstritten. Die ersten Hinweise lieferten humane Studien bei denen in der BAL und in bronchialen Biopsien von Probanden mit Asthma im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Anzahl von T-Helferzellen, sowie ein erhöhter Anteil an T-Helferzellen mit vermehrter mRNA-Expression der  $T_H2$ -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, nachgewiesen wurden (Robinson et al. 1992; Ying et al. 1997). Weitere Aufklärung erbrachte der Transfer antigenspezifischer Typ2-T-Helferzellen in SCID-Mäuse, welche keine funktionellen T-Zellen und B-Zellen ausbilden können. Die transferierten Typ2-T-Helferzellen lösten in den Empfängertieren typische Asthmaphänomene, wie pulmonale Entzündung, bronchiale Hyperreagibilität und vermehrte Mukusproduktion, aus (Randolph et al. 1999). Im weiteren Verlauf konnten zahlreiche Studien die bedeutende Rolle der Typ2-T-Helferzellen und der von ihnen sezernierten Zytokine bei der Pathogenese des Asthma bronchiale bestätigen (Barnes 2008).

Von den Zytokinen IL-4 und IL-13 ist bekannt, dass sie zu Becherzellhyperplasie und Hypersekretion von Schleim in der Lunge, sowie zu bronchialer Hyperreagibilität führen (Corren 2013). Die Differenzierung naiver  $CD4^+$ -T-Zellen zu Typ2-T-Helferzellen wird durch IL-4 begünstigt (Deo et al. 2010). Sowohl IL-4 (Steinke & Borish 2001) als auch IL-5 (Leckie et al. 2000) und IL-13 (Corren 2013) fördern die Migration eosinophiler Granulozyten in das Gewebe und unterstützen somit die  $T_H2$ -Entzündung in der asthmatischen Lunge.

Welche Rolle die Typ1- und Typ17-T-Helferzellen bei der Pathogenese des Asthma bronchiale einnehmen ist bis heute nicht genau geklärt. So gibt es einerseits Studien, die den IFN- $\gamma$  exprimierenden Typ1-T-Helferzellen einen protektiven Effekt für die Entstehung von Asthma bronchiale zuschreiben (Cohn et al. 1999; Shirakawa et al. 1997) und andererseits Studien, die davon ausgehen, dass dieser Zelltyp die pulmonale Entzündung bei Asthma unterstützt (Hansen et al. 1999). Dem von Typ17-T-Helferzellen sezernierte IL-17 werden eher entzündungsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Auch wurde bereits festgestellt, dass IL-17 im Sputum, in den PBMCs und im Lungengewebe von Patienten mit Asthma bronchiale in erhöhter Konzentration vorliegt (Alcorn et al. 2010; Bullens et al. 2006). Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass IL-17 auf Mucin-Gene einwirkt und dadurch an der für Asthma typischen Muskushypersekretion beteiligt sein könnte (Chen et al. 2003). Mehrere Studien belegen, dass bei Probanden mit Asthma im Vergleich zu Normalpersonen typischerweise ein höherer Anteil der T-Helferzellen IL-17 und ein niedrigerer Anteil IFN- $\gamma$  exprimiert (Chung 2001; Zhao et al. 2011). Allerdings gibt es auch Studien, die insbesondere bei schwerem Asthma einen erhöhten Serumspiegel von IFN- $\gamma$  nachweisen konnten (Berker et al. 2017). Von anderen Studien wird postuliert, dass mit zunehmender Schwere des Asthmas auch der Anteil IL-17 exprimierender T-Helferzellen steige (Zhao et al. 2011).

Zusammenfassend konnte durch die Untersuchung der Zytokinexpression von T-Helferzellen bestätigt werden, dass T-Helferzellen von Probanden mit Asthma nach Stimulation vermehrt Zytokine exprimieren, die den Typ2-T-Helferzellen zugeordnet werden können.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit sind also in Einklang zu bringen mit der Annahme vieler Studien, dass bei allergischem Asthma bronchiale eher ein  $T_H2$ -Zytokin-Milieu vorliegt (Berker et al. 2017; Hansen et al. 1999; Hansen 2001). Außerdem sprechen die Ergebnisse aus dieser Arbeit und hierbei insbesondere die signifikante Erhöhung der  $T_H2$ -Zytokinexpression bei Probanden mit Asthma für eine valide Wirksamkeit der verwendeten Zytokinstimulationsmethode. Die IFN- $\gamma$  und IL-17-Expression  $CD4^+$ -T-Zellen scheint abhängig vom Schweregrad des Asthmas zu sein. IFN- $\gamma$  hat vermutlich sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Effekte. IL-17 dagegen scheint eher proinflammatorische Eigenschaften zu besitzen. In dieser Arbeit könnte ein Grund für die ähnliche IFN- $\gamma$  und IL-17-Expression der T-Helferzellen beider Probandenkollektive die nur milde Ausprägung des Asthma bronchiale im Probandenkollektiv der Patienten mit Asthma sein.

#### **4.2 $CD24^{hi}$ $CD38^{hi}$ regulatorische B-Zellen haben möglicherweise einen protektiven Effekt bei Probanden mit leichtem Asthma bronchiale**

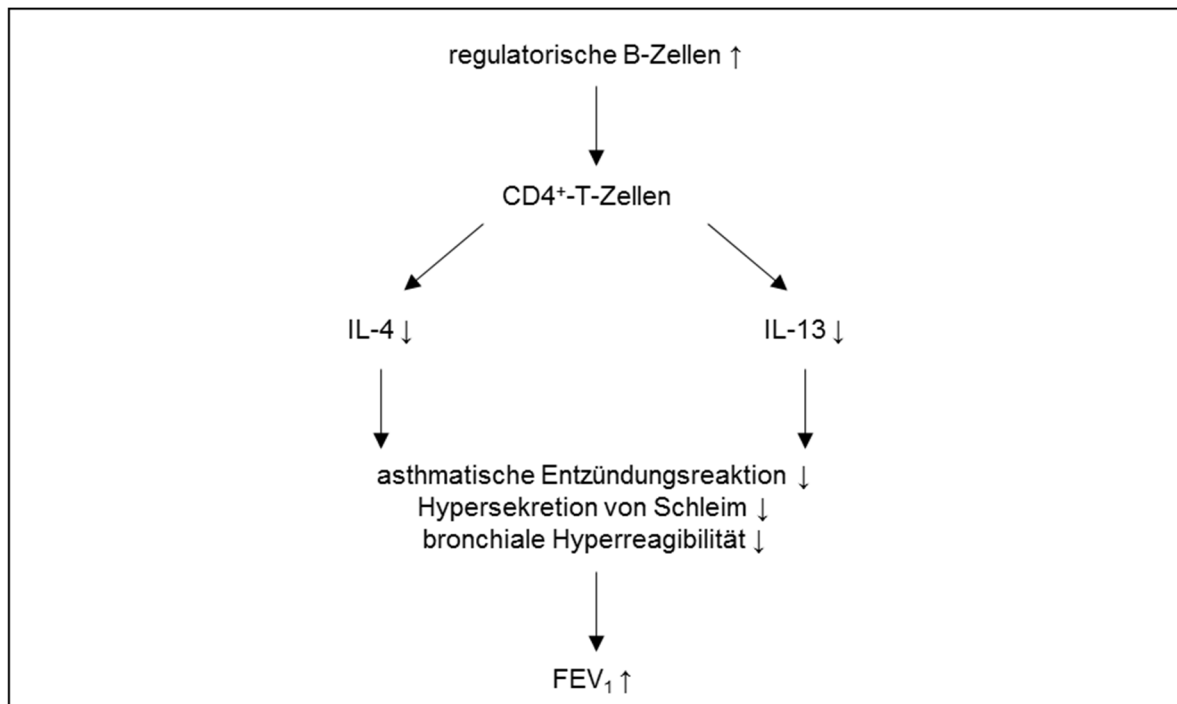
Zwischen den Probanden mit Asthma und der gesunden Kontrollgruppe bestand in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der absoluten Zellzahl  $CD24^{hi}$   $CD38^{hi}$  regulatorischer B-Zellen bzw. dem prozentualen Anteil  $CD24^{hi}$   $CD38^{hi}$  regulatorischer B-Zellen an allen B-Zellen im peripheren Vollblut. Dagegen bestand in einer Studie von Van der Vlugt et al. (2014) bei Probanden mit Asthma, im Gegensatz zu Probanden ohne Asthma, eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils  $CD24^{hi}$   $CD38^{hi}$  regulatorischer B-Zellen an allen B-Zellen. Bei der absoluten Zellzahl zeigte sich jedoch, wie auch in dieser Arbeit, kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Probandengruppen. Auch Blair et al. (2010) dokumentierten bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) ähnliche Ergebnisse wie Van der Vlugt et al. bei Probanden mit Asthma. Eine andere Studie zeigte bei Probanden mit rheumatoider Arthritis gegenüber einer Gruppe aus gesunden Probanden eine signifikante Erniedrigung der absoluten Anzahl  $CD24^{hi}$   $CD38^{hi}$  regulatorischer B-Zellen im peripheren Vollblut (Flores-Borja et al. 2013). Unterschiede zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den genannten Studien können womöglich auf die differierende Pathogenese der einzelnen Erkrankungen zurückgeführt werden. Vorstellbar wäre auch, dass die Probanden in der genannten Asthmastudie, im Gegensatz zu den Probanden aus dieser Arbeit, an schwerem Asthma litten, wofür besonders die inhalative Glukokortikoideinnahme einiger dieser

Probanden spricht. Weiterhin wurden die Messungen in der Asthmastudie von Van der Vlugt et al. im Gegensatz zu den Messungen in dieser Arbeit, an isolierten B-Zellen durchgeführt, was durch die einzelnen Zellisolierungsschritte möglicherweise zur Verfälschung der Messergebnisse geführt haben könnte.

Ein Unterschied zwischen Probanden mit Asthma und Normalpersonen in der Anzahl regulatorischer B-Zellen im peripheren Blut konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden. Interessanterweise zeigte sich in dieser Arbeit jedoch eine signifikante negative Korrelation zwischen der absoluten Anzahl CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> regulatorischer B-Zellen und dem prozentualen Anteil IL-4 und IL-13 exprimierender T-Helferzellen im peripheren Vollblut der Probanden mit Asthma. Bei der Kontrollgruppe ohne Asthma bestand keine signifikante Korrelation zwischen diesen Parametern. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> regulatorische B-Zellen über die Sekretion von IL-10 die Differenzierung regulatorischer T-Zellen begünstigen, während die Differenzierung naiver T-Zellen in Effektorzellen inhibiert wird (Flores-Borja et al. 2013; Mauri & Bosma 2012). Viele Studien heben die entscheidende Rolle der T<sub>H</sub>2-Zytokine bei der Pathogenese des Asthma bronchiale hervor (Cohn et al. 1998; Hansen et al. 1999; Randolph et al. 1999; Robinson et al. 1992; Ying et al. 1997). So führen sowohl IL-4 als auch IL-13 zu Becherzellhyperplasie und vermehrter Schleimproduktion in der Lunge, sowie zu bronchialer Hyperreagibilität (Corren 2013). Auch die asthmatische Entzündungsreaktion wird von IL-4 und IL-13, durch Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in die Lunge, unterstützt (Corren 2013; Steinke & Borish 2001). In einer Studie von Wenzel et al. (2016) konnte gezeigt werden, dass es durch Blockade des IL-4 und IL-13-Signalweges mit Dupilumab, einem mittlerweile zur Asthmatherapie zugelassenen monoklonalen Antikörper, zu einer signifikanten Verbesserung der Lungenfunktion bei Patienten mit Asthma kommt.

Es wäre denkbar, dass CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> regulatorische B-Zellen über eine Suppression der IL-4 und IL-13-Expression von T-Helferzellen bzw. über eine negative Regulation der Differenzierung naiver T-Zellen zu Typ2-T-Helferzellen einen protektiven Effekt, auf die für Asthma typische Hypersekretion von Mukus in der Lunge, sowie die bronchiale Hyperreagibilität und die asthmatische Entzündungsreaktion bzw. die daraus resultierende Obstruktion der Atemwege, besitzen.

Zu dieser Annahme passt auch, dass in dieser Arbeit eine signifikante positive Korrelation zwischen der absoluten Anzahl CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> regulatorischer B-Zellen und der FEV<sub>1</sub> (L) bzw. der FEV<sub>1</sub> (% vom Soll) bei Probanden mit Asthma nachgewiesen werden konnte. Die CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> regulatorischen B-Zellen könnten also maßgeblich an der Verbesserung der FEV<sub>1</sub>, über eine Verminderung der IL-4- und IL-13-Expression von T-Helferzellen, beteiligt sein (Abb. 4-1).



**Abb. 4-1: Schematische Darstellung des indirekten Einflusses regulatorischer B-Zellen auf die FEV<sub>1</sub> von Probanden mit Asthma.**

Über eine Suppression der T<sub>H</sub>2-Zytokinexpression in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen könnten regulatorische B-Zellen bei Probanden mit Asthma möglicherweise eine Verminderung der asthmatischen Entzündungsreaktion und der bronchialen Hyperreagibilität bewirken und somit zu einer besseren FEV<sub>1</sub> beitragen.

#### **4.3 Bei Probanden mit Asthma scheint im Vergleich zu Normalpersonen ein signifikant größerer Anteil der T-Helferzellen zu dem Treg-Subtyp „non-Tregs“ differenziert zu sein**

Es können zwei Hauptgruppen von Tregs unterschieden werden. Zum einen die in der Peripherie aus CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen entstandenen „induzierten“ Tregs (iTregs) und zum anderen die im Thymus generierten CD4<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup>) FoxP3<sup>+</sup> „natürlichen“ Tregs (nTregs) (Miyara et al. 2009; Sakaguchi et al. 2008; Sakaguchi et al. 2006). Nach Miyara et al. (2009) können CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> nTregs in drei phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden: FoxP3<sup>lo</sup> CD45RA<sup>+</sup> resting Tregs (rTregs), FoxP3<sup>hi</sup> CD45RA<sup>-</sup> activated Tregs (aTregs), sowie die zytokinsezernierenden FoxP3<sup>lo</sup> CD45RA<sup>-</sup> non-suppressive T cells (non-Tregs).

In dieser Arbeit wurde sowohl die Anzahl von rTregs, aTregs und non-Tregs als auch die Anzahl von CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup> Tregs im peripheren Vollblut von Probanden mit Asthma und Normalpersonen bestimmt. Da zwischen der Expression von CD127 und der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 eine negative Korrelation besteht ist CD127 ein praktischer Oberflächenmarker zur Identifikation FoxP3 exprimierender T-Zellen (Liu et



al. 2006; Seddiki et al. 2006). Aus diesem Grund stehen die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup> Tregs in dieser Arbeit auch repräsentativ für die Gesamtpopulation CD25<sup>hi</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs. In den durchgeführten Versuchen wurde beim Vergleich der absoluten Zellzahlen der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup> Tregs, sowie der rTregs, aTregs und der non-Tregs keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen Probanden mit Asthma und Normalpersonen beobachtet. Auch der prozentuale Anteil der rTregs und der aTregs an allen T-Helferzellen zeigte in dieser Arbeit keine Signifikanzen zwischen beiden Gruppen. Dagegen war der prozentuale Anteil der non-Tregs und der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup> Tregs an den T-Helferzellen bei Probanden mit Asthma signifikant höher als bei Normalpersonen.

Die Mehrheit aktueller wissenschaftlicher Studien deutet darauf hin, dass sowohl eine erniedrigte Anzahl als auch eine verminderte T-Zell-supprimierende-Wirkung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> Tregs an der Pathogenese allergischer Erkrankungen und des Asthma bronchiale beteiligt sein könnten (Yang et al. 2010, Luo et al. 2006, Ling et al. 2004). So zeigten beispielsweise die Ergebnisse einer Studie von Bakr et al. (2013) eine signifikante Erniedrigung des prozentualen Anteils CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs an den T-Helferzellen im peripheren Blut asthmakrankter Kinder gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe. Hartl et al. (2007) dagegen konnten eine signifikant verringerte prozentuale Anzahl sowie eingeschränkte T-Zell-supprimierende Wirkung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> Tregs im Lungengewebe asthmakrankter Kinder gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe feststellen. Mit diesen beiden Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass durch den Einsatz inhalativer Glukokortikoide über einige Wochen der Anteil dieser Tregs an den T-Helferzellen im Lungengewebe und im peripheren Vollblut von Patienten mit Asthma signifikant angehoben werden kann (Bakr et al. 2013; Hartl et al. 2007).

Singh et al. (2013) dagegen konnten, ähnlich wie in dieser Arbeit, bei Kindern mit Asthma einen signifikant höheren Anteil CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>lo</sup> Tregs an den T-Helferzellen gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe nachweisen. Diese Erhöhung führte die Studiengruppe jedoch auf den Gebrauch inhalativer Glukokortikoide durch ihre Probanden zurück. Überraschenderweise zeigte sich in dieser Arbeit im Gegensatz zu der Mehrzahl gängiger Studien eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils der regulatorischen T-Zellen an den T-Helferzellen im peripheren Blut von Probanden mit Asthma im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Der Einfluss von inhalativen Glukokortikoiden auf dieses Ergebnis kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da keiner der Probanden mit Asthma aus dieser Arbeit angab, inhalative Glukokortikoide einzunehmen. Ein Grund für dieses abweichende Ergebnis könnte die in dieser Arbeit verwendete Definition der regulatorischen T-Zellen als CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup> Tregs sein, welche von den

meisten vergleichbaren Studien durch die divergierende Kombination von Oberflächenmolekülen und insbesondere durch die Verwendung des Oberflächenmarkers CD127 zur Identifikation der regulatorischen T-Zellen, abweicht. Neben dem Gebrauch inhalativer Glukokortikoide könnte ein weiterer Einflussfaktor auf die Anzahl regulatorische T-Zellen im Blut der Asthmaschweregrad sein. So bestand in der genannten Studie von Bakr et al. (2013) beispielsweise bei Patienten mit Asthma mit nur milder Krankheitsausprägung, im Vergleich zu Patienten mit Asthma mit mittelschwerer Krankheitsausprägung, ein signifikant höherer Anteil der T-Helferzellen aus regulatorischen T-Zellen.

Miyara et al. (2009) dokumentierten im peripheren Vollblut von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses verglichen mit gesunden Probanden keinen signifikanten Unterschied der absoluten Zellzahlen von rTregs, aTregs und non-Tregs. Jedoch konnte die Studiengruppe einen signifikant höheren Anteil von rTregs und einen signifikant niedrigeren Anteil von aTregs an allen T-Helferzellen feststellen. Auffällig war, dass bei der non-Treg-Population die stärkste Signifikanz zwischen den beiden Probandengruppen vorlag und der prozentuale Anteil der non-Tregs an den T-Helferzellen wesentlich höher bei den Probanden mit systemischem Lupus erythematoses war. Sada et al. (2016) vermuten, dass non-Tregs an Immunmechanismen, die zum vaskulären Remodeling bei idiopathischer pulmonaler arterieller Hypertonie (IPAH) führen, beteiligt sein könnten. Im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe dokumentierte die Studiengruppe im peripheren Vollblut von IPAH-Patienten eine signifikant höhere Anzahl von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs, sowie einen signifikant höheren prozentualen Anteil von non-Tregs, aber nicht von rTregs und aTregs, an den T-Helferzellen.

Insgesamt lassen die Ergebnisse aus den genannten Studien vermuten, dass zumindest bei Probanden mit Asthma mit mittelschwerer und schwerer Krankheitsausprägung im Gegensatz zu Gesunden ein geringerer prozentualer Anteil der T-Helferzellen im peripheren Vollblut aus regulatorischen T-Zellen besteht.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit lassen die Spekulation zu, dass bei Probanden mit Asthma im Gegensatz zu einer gesunden Kontrollgruppe ein signifikant größerer Anteil der T-Helferzellen zu dem Treg-Subtyp „non-Tregs“ differenziert ist. Non-Tregs zeigen in vitro keine immunsuppressiven Eigenschaften und verstärken die T-Zellproliferation, wohingegen rTregs und aTregs die Proliferation naiver T-Zellen unterdrücken (Miyara et al. 2009). Womöglich spielt ein Ungleichgewicht zwischen den proinflammatorischen non-Tregs einerseits und den immunsuppressiven rTregs und aTregs andererseits eine besondere Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, einschließlich des Asthma bronchiale.

#### **4.4 Die CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg-Population von Probanden mit allergischem Asthma bronchiale ist durch ein erniedrigtes T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Potential charakterisiert**

Bei der Untersuchung der Zytokinexpression der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen von Probanden mit Asthma und Normalpersonen zeigte sich in dieser Arbeit, dass die T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 nach PMA-Ionomycin-Stimulation nur minimal exprimiert wurden (< 1%), sodass eine valide statistische Auswertung nicht möglich war. Dagegen konnte eine signifikante Expression des T<sub>H</sub>1-Zytokins IFN- $\gamma$  und des T<sub>H</sub>17-Zytokins IL-17 in CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden, wobei diese bei Probanden mit allergischem Asthma signifikant erniedrigt war.

Das Konzept, dass regulatorische T-Zellen eine eigene Zelllinie der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, also gänzlich abgrenzbar von den Effektorsubtypen der T-Helferzellen sind und ausschließlich immunsuppressive Effekte besitzen, wird durch unterschiedliche Studien angezweifelt. So konnten in mehreren humanen Studien bei gesunden Probanden CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen mit der Fähigkeit IL-17 zu exprimieren identifiziert werden. Diese CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen zeigten in vitro immunsuppressive Eigenschaften, jedoch konnten sie nach Stimulation (IL-1 $\beta$ , IL-6) auch IL-17 sezernieren, wodurch immunsuppressive Eigenschaften zugunsten von proinflammatorischen Effekten gedämpft wurden; interessanterweise stellte sich diese Begebenheit als reversibel heraus (Beriou et al. 2009; Voo et al. 2009). Ferner ist für rTregs, aTregs und non-Tregs nach in vitro Stimulation (PMA, Ionomycin) die Synthese von IFN- $\gamma$  und IL-17 beschrieben, wobei diese Zytokine hauptsächlich von der Population der non-Tregs exprimiert wurden (Miyara et al. 2009).

Auch in dieser Arbeit konnte ähnlich wie in den genannten Studien eine Expression von IFN- $\gamma$  und IL-17 durch CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs nach Stimulation (PMA, Ionomycin) nachgewiesen werden. Durch diese Daten wird die Hypothese einiger Studien, dass die immunsuppressiven Effekte, die den regulatorischen T-Zellen zugeschrieben werden in Wirklichkeit zumindest teilweise von den konventionellen Effektorzellen wie den Typ1-T-Helferzellen ausgeübt werden, unterstützt (Corthay 2009). Die Population der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen scheint jedenfalls Zellen mit T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Potential zu enthalten. Denkbar wäre auch, dass eine komplexere Stimulationsmethode benötigt wird um die T<sub>H</sub>2-Zytokin-Expression in CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs zu induzieren und somit bei Probanden mit Asthma die T<sub>H</sub>1- und die T<sub>H</sub>17-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellpopulation, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, zungunsten der T<sub>H</sub>2-Zellen erniedrigt wären. Da bei Probanden mit Asthma ein signifikant größerer Anteil der T-Helferzellen zu non-Tregs differenziert ist, könnte diese Hypothese auch insbesondere auf diesen Subtyp regulatorischer T-Zellen zutreffen. Um diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen.

#### **4.5 Die Anzahl von mDCs und pDCs im peripheren Blut von Probanden mit Asthma variiert und ist von der Allergenexposition abhängig**

In dieser Arbeit fiel beim Vergleich der absoluten Zellzahlen von mDCs und pDCs zwischen Normalpersonen und Probanden mit Asthma ein statistisch relevanter Unterschied auf: Im Blut der Probanden mit Asthma waren signifikant weniger mDCs und pDCs als bei den Normalpersonen nachweisbar.

In der Literatur herrscht jedoch Uneinigkeit darüber ob die mDC- bzw. pDC-Zahl im peripheren Vollblut von Probanden mit Asthma gegenüber Normalpersonen eher erniedrigt (Dua et al. 2013; Wright et al. 2015), ähnlich oder sogar erhöht (Spears et al. 2011) ist. Es wird angenommen, dass die Anzahl zirkulierender mDCs und pDCs bei Patienten mit Asthma von der Exposition gegenüber Allergenen abhängt (Upham & Xi 2016). Diese Hypothese wird durch mehrere Studien bestätigt, in denen bei Probanden mit Asthma nach inhalativer Allergenprovokation ein Abfall der mDCs und der pDCs im peripheren Blut und ein Anstieg der mDC- und der pDC-Zahl in der BAL beobachtet wurde (Bratke et al. 2007; Farrell et al. 2007; Jahnsen 2001).

Nach aktueller Studienlage scheint demnach die Anzahl der pDCs und der mDCs im peripheren Blut von Patienten mit Asthma in Abhängigkeit einer Allergenexposition zu fluktuieren. Die in dieser Arbeit gemessene signifikant niedrigere Anzahl von mDCs und pDCs im peripheren Blut der Probanden mit Asthma steht möglicherweise in Zusammenhang mit der im Rahmen des Asthmas potentiell stattfindenden Allergenexposition.

#### **4.6 Die Expression der T-Zell-kostimulatorischen bzw. T-Zell-koinhibitorischen Moleküle CD86, ICOS-L und PD-L1 auf mDCs und pDCs des peripheren Blutes ist bei Normalpersonen und Probanden mit Asthma ähnlich**

Zwischen Probanden mit Asthma und Normalpersonen konnte beim Vergleich des prozentualen Anteils CD86 exprimierender mDCs und pDCs im peripheren Blut kein statistisch relevanter Unterschied zwischen beiden Gruppen beobachtet werden. CD86 kann über die Rezeptoren CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen ein T-Zell-kostimulatorisches bzw. ein T-Zell-koinhibitorisches Signal auslösen (Greenwald et al. 2005; Rulifson et al. 1997). Der kostimulatorische Rezeptor CD28 verstärkt die Immunantwort und fördert die Differenzierung naiver T-Zellen in Effektorzellen (Rulifson et al. 1997). Dagegen schwächt der koinhibitorische Rezeptor CTLA-4 die Immunantwort ab bzw. fördert die Immuntoleranz der T-Zellen (Chambers 2001; Greenwald et al. 2005). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Überexpression von CD86 durch APCs mit der Entstehung allergischer Erkrankungen und Asthma korreliert (Lombardi et al. 2010). Hofer et al. (1998) dokumentierten nach inhalativer Allergenprovokation von Probanden mit Asthma eine

signifikant höhere Expression von CD86 durch B-Lymphozyten als bei Probanden mit Asthma ohne inhalative Allergenprovokation und bei einer gesunden Kontrollgruppe. Die Beobachtungen, die in dieser Arbeit bei mDCs und pDCs gemacht wurden, sind in Einklang zu bringen mit den Ergebnissen, die Hofer et al. bei einer anderen Gruppe von APCs, den B-Zellen, dokumentiert haben. Die Frage, ob ähnlich wie auf B-Zellen auch auf mDCs und pDCs von Patienten mit Asthma nach inhalativer Allergenprovokation signifikant häufiger CD86 exprimiert wird, bleibt allerdings offen.

Beim Vergleich des prozentualen Anteils ICOS-L exprimierender mDCs bzw. pDCs zwischen Probanden mit Asthma und Normalpersonen bestand in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied. Der T-Zell-kostimulatorische Ligand ICOS-L beeinflusst über den auf T-Zellen exprimierten Rezeptor ICOS die Zytokinsynthese und die Migration von Typ2-T-Helferzellen, jedoch nicht die Differenzierung einer naiven T-Zelle zu einer Effektorzelle (McAdam et al. 2000; Tesciuba et al. 2008). So konnte beispielsweise in einem Mausmodell gezeigt werden, dass durch ICOS-Blockade zwar die Zytokinsynthese von Typ2-T-Helferzellen, nicht aber die Differenzierung naiver T-Zellen in Typ2-T-Helferzellen gehemmt wurde (Tesciuba et al. 2001). Die Annahme, dass ICOS-L eventuell häufiger von dendritischen Zellen der Probanden mit Asthma exprimiert wird konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Auch beim Vergleich des prozentualen Anteils PD-L1 exprimierender mDCs und pDCs im peripheren Blut fiel zwischen Probanden mit Asthma und Normalpersonen kein statistisch relevanter Unterschied auf. Die T-Zell-koinhibitorischen Liganden PD-L1 und PD-L2 binden den auf aktivierten T-Zellen exprimierten Rezeptor PD-1. Mehrere Studien zeigten, dass durch die Bindung von PD-L1 oder PD-L2 an PD-1 die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Proliferation und Zytokinexpression von aktivierten T-Zellen inhibiert wird (Freeman et al. 2000; Latchman et al. 2001). Akbari et al. (2010) konnten bei PD-L1-defizienten Mäusen eine signifikante Reduktion und bei PD-L2-defizienten Mäusen dagegen einen signifikanten Anstieg der bronchialen Hyperreagibilität bei inhalativer Allergenprovokation zuvor sensibilisierter Mäuse feststellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PD-L2-defiziente Mäuse eine stärkere pulmonale Entzündungsreaktion entwickeln als eine Kontrollgruppe bestehend aus Wildtyp-Mäusen. PD-L1 wird zudem auf endobronchialen mDCs und pDCs 24 Stunden nach segmentaler Allergenprovokation vermehrt exprimiert, während PD-L2 auf endobronchialen mDCs signifikant seltener exprimiert wird (Bratke et al. 2017). Diese Arbeit lässt lediglich die Vermutung zu, dass PD-L1 auf mDCs und pDCs von Normalpersonen und Probanden mit Asthma mit ähnlicher Häufigkeit exprimiert wird. Ein leichtes Asthma scheint hierbei keinen Einfluss auf die PD-L1-Expression dieser Zellen zu haben.

#### **4.7 Die Granzym B-Expression in pDCs des peripheren Blutes ist bei Normalpersonen und Probanden mit Asthma ähnlich**

In dieser Arbeit wurde die Granzym B-Expression in pDCs des peripheren Blutes von Probanden mit Asthma und Normalpersonen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass nahezu alle pDCs beider Gruppen positiv für Granzym B waren, weshalb im Anschluss die Expressionsintensität vergleichend untersucht wurde. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Normalpersonen und Probanden mit Asthma festgestellt werden.

Granzyme sind Serinproteasen, die typischerweise von CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen-T-Zellen und NK-Zellen exprimiert werden und an der Initiierung einer Apoptose in Zielzellen beteiligt sind. Beim Menschen können die Granzyme A, B, H, K und M unterschieden werden. Granzym B kann sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig in Zielzellen Apoptose initiieren (Kuwana et al. 2002; Lord et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene inflammatorische Erkrankungen viraler, bakterieller, autoimmuner und allergischer Genese, mit erhöhten Mengen von löslichem Granzym B im Serum einhergehen (Buzza & Bird 2006). Verschiedene Studien konnten eine Expression von Granzym B in pDCs, jedoch nicht in mDCs, nachweisen (Bratke et al. 2010; Rissoan et al. 2002). Die Autoren mehrerer Studien mutmaßen, dass von pDCs sezerniertes Granzym B eine spezielle Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen spielen könnte. So beschrieben Jahrsdörfer et al. (2010), dass pDCs durch die Sekretion von Granzym B in der Lage sind die T-Zellproliferation zu hemmen und somit eine immunsuppressive Wirkung zu entfalten. Bratke et al. (2010; 2007) konnten 24 Stunden nach inhalativer Allergenprovokation bei Probanden mit Asthma nicht nur eine vermehrte Anzahl endobronchialer pDCs, sondern auch eine erhöhte Expression von Granzym B in endobronchialen pDCs und eine gesteigerte Konzentration von löslichem Granzym B in der BAL, messen. Dagegen verringerte sich die Anzahl der pDCs im peripheren Blut. Die Expressionintensität von Granzym B in Blut-pDCs wurde durch die Allergenprovokation nicht beeinflusst.

#### **4.8 PD-L1 ist möglicherweise an der Generierung von aTregs bei Probanden mit allergischem Asthma beteiligt**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die prozentuale PD-L1-Expression der mDCs und pDCs von Probanden mit Asthma signifikant positiv mit dem prozentualen Anteil der aTregs an den T-Helferzellen korreliert. Bei Probanden ohne Asthma konnte keine Korrelation zwischen den beiden Parametern nachgewiesen werden.

Der T-Zell-koinhibitorische Ligand PD-L1 wird auf einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen konstitutiv exprimiert (Keir et al. 2008). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von PD-L1 an den korrespondierenden Rezeptor PD-1 auf

aktivierten T-Zellen deren Proliferation und Zytokinexpression inhibiert wird (Freeman et al. 2000; Latchman et al. 2001). Außerdem wird angenommen, dass dendritische Zellen über die Expression von PD-L1 auf ihrer Oberfläche die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen beeinflussen können (Brown et al. 2003). Für diese Annahme spricht, dass PD-L1 die Expression des für regulatorische T-Zellen typischen Transkriptionsfaktors FoxP3 in naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen anregt und sogar steigert (Francisco et al. 2009). Eine stetige Expression von FoxP3 wird als wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Funktion regulatorischer T-Zellen angesehen (Kim et al. 2007; Williams & Rudensky 2007). Weiterhin wird laut Francisco et al. (2009) die Funktion und die Entstehung von FoxP3<sup>+</sup> iTregs aus naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch den Liganden PD-L1 gefördert. Möglicherweise ist die PD-L1-Expression dendritischer Zellen, wie bereits von Brown et al. (2003) vermutet, eng mit der FoxP3-Expression naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen assoziiert, sodass sie womöglich auf diese Weise auch zur Entstehung der FoxP3-positiven aTregs bei Patienten mit Asthma beiträgt.

## 5 Zusammenfassung

Unter den chronisch entzündlichen Erkrankungen nimmt das Asthma bronchiale auf Grund seiner hohen Prävalenz eine herausragende Rolle ein. Neben entzündlich veränderten Atemwegen ist die Erkrankung durch bronchiale Hyperreagibilität und variable Atemwegsobstruktion charakterisiert. Zur Immunpathogenese des Asthma bronchiale tragen eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen und Moleküle bei.

In dieser Arbeit wurden Unterschiede zwischen immunregulatorischen Mechanismen und daran beteiligter Zellen und Moleküle bei Probanden mit allergischem Asthma bronchiale und einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Neben durchflusszytometrischen Verfahren kamen hierfür auch Immunassay-Verfahren zum Einsatz. Besondere Beachtung wurde in diesem Zusammenhang den regulatorischen B-Zellen, T-Helferzellen und verschiedenen Subpopulationen regulatorischer T-Zellen sowie mDCs und pDCs gewidmet.

Auch in dieser Arbeit konnte, ähnlich wie schon durch verschiedene Studien dokumentiert, gezeigt werden, dass bei Probanden mit Asthma, im Vergleich zu Gesunden, ein erhöhter Anteil der T-Helferzellen zu  $T_H2$ -Zellen differenziert zu sein scheint und der Pathogenese des Asthma bronchiale zumindest teilweise eine Verschiebung des  $T_H1/T_H2$ -Zytokinegleichgewichts zugunsten der  $T_H2$ -Zytokine zugrunde liegen könnte.

Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass den  $CD24^{hi} CD38^{hi}$  regulatorischen B-Zellen möglicherweise eine protektive Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas zukommt. Es zeigte sich in der Gruppe der Probanden mit Asthma eine negative Korrelation dieser regulatorischen B-Zellen mit IL-4 und IL-13 exprimierenden  $CD4^+$  T-Zellen sowie eine positive Korrelation mit der Lungenfunktion. Aufgrund dessen kann spekuliert werden, dass  $CD24^{hi} CD38^{hi}$  Bregs über die negative Regulation der  $T_H2$ -Zytokinexpression der  $CD4^+$  T-Zellen zu einer Verbesserung der Lungenfunktion von Patienten mit Asthma beitragen.

Auch die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Pathogenese von Allergien und Asthma bronchiale ist Gegenstand unterschiedlicher Studien. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die  $CD4^+ FoxP3^+$  Tregs von Probanden mit Asthma vermutlich durch ein erniedrigtes  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Potential charakterisiert sind. Darüber hinaus wird durch den Nachweis der Expression von IFN- $\gamma$  und IL-17 durch  $CD4^+ FoxP3^+$  Tregs beider Probandengruppen die Hypothese einiger Studien, dass regulatorische T-Zellen nicht gänzlich abgrenzbar von den Effektorsubtypen der  $CD4^+$  T-Zellen sind und folglich nicht ausschließlich immunsuppressive Effekte besitzen, unterstützt.

Für eine Subpopulation „natürlicher“ im Thymus generierter Tregs, die non-Tregs, wurden bereits proinflammatorische, jedoch keine immunsuppressiven, Eigenschaften beschrieben. Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass ihr Anteil an den T-Helferzellen im



peripheren Blut von Probanden mit Asthma signifikant höher war im Vergleich zu gesunden Probanden. Möglicherweise spielt ein Ungleichgewicht zwischen den proinflammatorischen non-Tregs einerseits und den immunsuppressiven rTregs und aTregs andererseits eine besondere Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale.

Bei der Untersuchung von mDCs und pDCs konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Probanden mit Asthma signifikant weniger mDCs und pDCs im peripheren Blut nachweisbar waren, als bei Normalpersonen. Nach aktueller Studienlage scheint die Anzahl von mDCs und pDCs im peripheren Blut von Probanden mit Asthma in Abhängigkeit einer pulmonalen Allergenexposition zu fluktuieren. Hierfür wird eine Migration dieser Zellen aus dem Blut in das Lungengewebe verantwortlich gemacht.

Bei der Untersuchung der Oberflächenmoleküle CD86, PD-L1 und ICOS-L auf mDCs und pDCs konnte eine Expression aller Moleküle auf beiden Zelltypen nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Probanden mit Asthma und Normalpersonen. Allerdings konnte bei Probanden mit Asthma eine signifikante positive Korrelation zwischen der PD-L1-Expression auf mDCs bzw. pDCs und dem prozentualen Anteil der aTregs an den T-Helferzellen nachgewiesen werden, weswegen DCs über die PD-L1-Expression möglicherweise an der Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aTregs beteiligt sind.

Zusammenfassend wird die Hypothese bestätigt, dass bei der Pathogenese des Asthma bronchiale ein T<sub>H</sub>2-Zytokinmilieu eine besondere Rolle spielt. Durch Beeinflussung dieses T<sub>H</sub>2-Zytokinmilieus haben CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> regulatorische B-Zellen möglicherweise einen protektiven Effekt auf die Asthmapathogenese. Zur Beantwortung der Frage, ob den „natürlichen“ CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs eher eine proinflammatorische oder eine immunsuppressive Rolle bei Patienten mit Asthma zukommt, bedarf es noch weiterer Untersuchungen zur Zytokinsynthese dieser Zellen. Des Weiteren könnte ein Ungleichgewicht zwischen den proinflammatorischen non-Tregs einerseits und den immunsuppressiven rTregs und aTregs andererseits eine besondere Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale spielen.

## 6 Literaturverzeichnis

Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H., Ishida Y., Tsubata T., Yagita H., Honjo T. (1996): **Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes.** International immunology. 8(5):765–772.

Akbari O., Stock P., Singh A. K., Lombardi V., Lee W. L., Freeman G. J., Sharpe A. H., Umetsu D. T., Dekruyff R. H. (2010): **PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions.** Mucosal immunology. 3(1):81–91.

Alcorn J. F., Crowe C. R., Kolls J. K. (2010): **TH17 cells in asthma and COPD.** Annual review of physiology. 72:495–516.

Alegre M. L., Frauwirth K. A., Thompson C. B. (2001): **T-cell regulation by CD28 and CTLA-4.** Nature reviews. Immunology. 1(3):220–228.

Anderson A. E., Isaacs J. D. (2008): **Tregs and rheumatoid arthritis.** Acta reumatologica portuguesa. 33(1):17–33.

Anderson S. D. (2010): **Indirect challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: Its measurement and clinical significance.** Chest. 138(2 Suppl):25-30.

Bakr S. I., Mahran M. Z., Soliman D. A. (2013): **Role of regulatory CD4+CD25+ Foxp3 T cells in bronchial asthma in egyptian children.** The Egyptian journal of immunology. 20(2):29–38.

Banchereau J., Steinman R. M. (1998): **Dendritic cells and the control of immunity.** Nature. 392(6673):245–252.

Barnes P. J. (2008): **The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.** The Journal of clinical investigation. 118(11):3546–3556.

Beres A. J., Drobyski W. R. (2013): **The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease.** Frontiers in immunology. 4:163.

Beriou G., Costantino C. M., Ashley C. W., Yang L., Kuchroo V. K., Baecher-Allan C., Hafler D. A. (2009): **IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function.** Blood. 113(18):4240–4249.

Berker M., Frank L. J., Geßner A. L., Grassl N., Holtermann A. V., Höppner S., Kraef C., Leclaire M. D., Maier P., Messerer D. A. C., Möhrmann L., Nieke J. P., Schoch D., Soll D., Woopen C. M. P. (2017): **Allergies - A T cells perspective in the era beyond the TH1/TH2 paradigm.** Clinical immunology. 174:73–83.

Bin Dhuban K., Piccirillo C. A. (2015): **The immunological and genetic basis of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome.** Current opinion in allergy and clinical immunology. 15(6):525–532.

Blair P. A., Norena L. Y., Flores-Borja F., Rawlings D. J., Isenberg D. A., Ehrenstein M. R., Mauri C. (2010): **CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients.** Immunity. 32(1):129–140.

Bouaziz J.-D., Calbo S., Maho-Vaillant M., Saussine A., Bagot M., Bensussan A., Musette P. (2010): **IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro.** European journal of immunology. 40(10):2686–2691.

Bratke K., Fritz L., Nokodian F., Geißler K., Garbe K., Lommatzsch M., Virchow J. C. (2017): **Differential regulation of PD-1 and its ligands in allergic asthma.** Clinical and experimental allergy. 47(11):1417-1425

Bratke K., Lommatzsch M., Julius P., Kuepper M., Kleine H.-D., Luttmann W., Virchow J. C. (2007): **Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge.** Thorax. 62(2):168–175.

Bratke K., Nielsen J., Manig F., Klein C., Kuepper M., Geyer S., Julius P., Lommatzsch M., Virchow J. C. (2010): **Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: A role in allergic inflammation.** Clinical and experimental allergy. 40(7):1015–1024.

Bretscher P. A. (1999): **A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 96(1):185–190.

Brown J. A., Dorfman D. M., Ma F.-R., Sullivan E. L., Munoz O., Wood C. R., Greenfield E. A., Freeman G. J. (2003): **Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production.** The Journal of Immunology. 170(3):1257–1266.

Brunkow M. E., Jeffery E. W., Hjerrild K. A., Paeper B., Clark L. B., Yasayko S. A., Wilkinson J. E., Galas D., Ziegler S. F., Ramsdell F. (2001): **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** Nature genetics. 27(1):68–73.

Buhl R., Berdel D., Criege C.-P., Gillissen A., Kardos P., Kroegel C., Leupold W., Lindemann H., Magnussen H., Nowak D., Pfeiffer-Kascha D., Rabe K., Rolke M., Schultze-Werninghaus G., Sitter H., Ukena D., Vogelmeier C., Welte T., Wettengel R., Worth H. (2006): **Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma - herausgegeben von der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.** Pneumologie. 60(3):139–177.

Bullens D. M. A., Truyen E., Coteur L., Dilissen E., Hellings P. W., Dupont L. J., Ceuppens J. L. (2006): **IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: Linking T cell driven inflammation and granulocytic influx?** Respiratory research. 7:135.

Burastero S. E., Magnani Z., Confetti C., Abbruzzese L., Oddera S., Balbo P., Rossi G. A., Crimi E. (1999): **Increased expression of the CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous TH2 lymphocytes.** The Journal of allergy and clinical immunology. 103(6):1136–1142.

Buzza M. S., Bird P. I. (2006): **Extracellular granzymes: Current perspectives.** Biological chemistry. 387(7):827–837.

Cagnoni E. F., Ferreira D. S., Ferraz da Silva L. F., Nicoletti Carvalho Petry A. L., Gomes dos Santos A. B., Rodrigues Medeiros M. C., Dolhnikoff M., Rabe K. F., Mauad T. (2015): **Bronchopulmonary lymph nodes and large airway cell trafficking in patients with fatal asthma.** The Journal of allergy and clinical immunology. 135(5):1352-1357.

Chambers C. A. (2001): **The expanding world of co-stimulation: The two-signal model revisited.** Trends in immunology. 22(4):217–223.

Chen Y., Thai P., Zhao Y.-H., Ho Y.-S., DeSouza M. M., Wu R. (2003): **Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop.** The Journal of biological chemistry. 278(19):17036–17043.

Chung F. (2001): **Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: Interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma.** Mediators of inflammation. 10(2):51–59.

Cohn L., Homer R. J., Niu N., Bottomly K. (1999): **T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production.** The Journal of experimental medicine. 190(9):1309–1318.

Cohn L., Tepper J. S., Bottomly K. (1998): **IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells.** Journal of immunology. 161(8):3813–3816.

Collins M., Ling V., Carreno B. M. (2005): **The B7 family of immune-regulatory ligands.** Genome biology. 6(6):223.

Corren J. (2013): **Role of interleukin-13 in asthma.** Current allergy and asthma reports. 13(5):415–420.

Corthay A. (2009): **How do regulatory T cells work?** Scandinavian journal of immunology. 70(4):326–336.

Coyle A. J., Gutierrez-Ramos J. C. (2001): **The expanding B7 superfamily: Increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function.** Nature immunology. 2(3):203–209.

Deo S. S., Mistry K. J., Kakade A. M., Niphadkar P. V. (2010): **Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma.** Lung India: Official organ of Indian Chest Society. 27(2):66–71.

Dua B., Smith S., Kinoshita T., Imaoka H., Gauvreau G., O'Byrne P. (2013): **Myeloid dendritic cells type 2 in allergic asthma.** Allergy. 68(10):1322–1326.

Dua B., Tang W., Watson R., Gauvreau G., O'Byrne P. M. (2014): **Myeloid dendritic cells type 2 after allergen inhalation in asthmatic subjects.** Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 44(7):921–929.

Dua B., Watson R. M., Gauvreau G. M., O'Byrne P. M. (2010): **Myeloid and plasmacytoid dendritic cells in induced sputum after allergen inhalation in subjects with asthma.** The Journal of allergy and clinical immunology. 126(1):133–139.

Dullaers M., Bruyne R. de, Ramadani F., Gould H. J., Gevaert P., Lambrecht B. N. (2012): **The who, where, and when of IgE in allergic airway disease.** The Journal of allergy and clinical immunology. 129(3):635–645.

El-Gammal A., Oliveria J.-P., Howie K., Watson R., Mitchell P., Chen R., Baatjes A., Smith S., Al-Sajee D., Hawke T. J., Killian K. J., Gauvreau G. M., O'Byrne P. M. (2016): **Allergen-induced Changes in Bone Marrow and Airway Dendritic Cells in Subjects with Asthma.** American journal of respiratory and critical care medicine. 194(2):169–177.

Enk A. H. (2005): **Dendritic cells in tolerance induction.** Immunology letters. 99(1):8–11.

Farrell E., O'Connor T. M., Duong M., Watson R. M., Strinich T., Gauvreau G. M., O'Byrne P. M. (2007): **Circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells after allergen inhalation in asthmatic subjects.** *Allergy*. 62(10):1139–1145.

Finotto S., Galle P. R., Neurath M. F. (2000): **Zur Immunpathogenese des Asthma bronchiale (Immunopathogenesis of bronchial asthma).** *Pneumologie*. 54(9):412–418.

Flores-Borja F., Bosma A., Ng D., Reddy V., Ehrenstein M. R., Isenberg D. A., Mauri C. (2013): **CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation.** *Science translational medicine*. 5(173):173ra23.

Fontenot J. D., Gavin M. A., Rudensky A. Y. (2003): **Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells.** *Nature immunology*. 4(4):330–336.

Forster R., Davalos-Missslitz A. C., Rot A. (2008): **CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance.** *Nature reviews. Immunology*. 8(5):362–371.

Francisco L. M., Salinas V. H., Brown K. E., Vanguri V. K., Freeman G. J., Kuchroo V. K., Sharpe A. H. (2009): **PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells.** *The Journal of experimental medicine*. 206(13):3015–3029.

Freeman G. J., Long A. J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L. J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M. C., Horton H. F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M. R., Carreno B. M., Collins M., Wood C. R., Honjo T. (2000): **Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.** *The Journal of experimental medicine*. 192(7):1027–1034.

Gershon R. K., Kondo K. (1971): **Infectious immunological tolerance.** *Immunology*. 21(6):903–914.

Gibson G. J., Loddenkemper R., Lundback B., Sibille Y. (2013): **Respiratory health and disease in europe: The new european lung white book.** The European. respiratory journal 42(3):559–563.

Global Asthma Network (2018): **The Global Asthma Report 2018.**

Global Initiative for Asthma (2018): **Global Strategy for Asthma Management and Prevention.**

Greenwald R. J., Freeman G. J., Sharpe A. H. (2005): **The B7 family revisited.** Annual review of immunology. 23:515–548.

Guzman-Genuino R. M., Diener K. R. (2017): **Regulatory B cells in pregnancy: Lessons from autoimmunity, graft tolerance and cancer.** Frontiers in immunology. 8:172.

Hammad H., Chieppa M., Perros F., Willart M. A., Germain R. N., Lambrecht B. N. (2009): **House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells.** Nature medicine. 15(4):410–416.

Hansen G. (2001): **Das Th1/Th2-Paradigma bei allergischem Asthma bronchiale.** Monatsschrift Kinderheilkunde. 149(2):112–119.

Hansen G., Berry G., Dekruyff R. H., Umetsu D. T. (1999): **Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation.** The Journal of clinical investigation. 103(2):175–183.

Hartl D., Koller B., Mehlhorn A. T., Reinhardt D., Nicolai T., Schendel D. J., Griesse M., Krauss-Etschmann S. (2007): **Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> regulatory T cells in pediatric asthma.** The Journal of allergy and clinical immunology. 119(5):1258–1266.

Hofer M. F., Jirapongsananuruk O., Trumble A. E., Leung D. Y. (1998): **Upregulation of B7.2, but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma.** The Journal of allergy and clinical immunology. 101:96–102.



Holt P. G., Haining S., Nelson D. J., Sedgwick J. D. (1994): **Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways.** Journal of immunology. 153(1):256–261.

Hoogsteden H. C., Verhoeven G. T., Lambrecht B. N., Prins J. B. (1999): **Airway inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease with special emphasis on the antigen-presenting dendritic cell: Influence of treatment with fluticasone propionate.** Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2(29 Suppl):116–124.

Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. (2003): **Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.** Science. 299(5609):1057–1061.

Jäger A., Kuchroo V. K. (2010): **Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation.** Scandinavian journal of immunology. 72(3):173–184.

Jahnsen F. L. (2001): **Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge.** Thorax. 56(11):823–826.

Jahrsdörfer B., Vollmer A., Blackwell S. E., Maier J., Sontheimer K., Beyer T., Mandel B., Lunov O., Tron K., Nienhaus G. U., Simmet T., Debatin K.-M., Weiner G. J., Fabricius D. (2010): **Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion.** Blood. 115(6):1156–1165.

Jarrossay D., Napolitani G., Colonna M., Sallusto F., Lanzavecchia A. (2001): **Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells.** European journal of immunology. 31(11):3388–3393.

Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C. (1993): **Detection of intracellular cytokines by flow cytometry.** Journal of immunological methods. 159(1-2):197–207.

Kadowaki N., Antonenko S., Lau J. Y., Liu Y. J. (2000): **Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity.** The Journal of experimental medicine. 192(2):219–226.

Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R. W., Kastelein R. A., Bazan F., Liu Y. J. (2001): **Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens.** The Journal of experimental medicine. 194(6):863–869.

Katz S. I., Parker D., Turk J. L. (1974): **B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions.** Nature. 251(5475):550–551.

Kau A. L., Korenblat P. E. (2014): **Anti-interleukin 4 and 13 for asthma treatment in the era of endotypes.** Current opinion in allergy and clinical immunology. 14(6):570–575.

Keir M. E., Butte M. J., Freeman G. J., Sharpe A. H. (2008): **PD-1 and its ligands in tolerance and immunity.** Annual review of immunology. 26:677–704.

Kim J. M., Rasmussen J. P., Rudensky A. Y. (2007): **Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice.** Nature immunology. 8(2):191–197.

Kirsch F., Teuner C. M., Menn P., Leidl R. (2013): **Costs of illness for asthma and COPD in adults in Germany.** Gesundheitswesen. 75(7):413–423.

Kobayashi T., Iijima K., Kita H. (2003): **Marked airway eosinophilia prevents development of airway hyper-responsiveness during an allergic response in IL-5 transgenic mice.** Journal of immunology. 170(11):5756–5763.

Kroegel C., Costabel U. (2014): **Klinische Pneumologie: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis.** Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Kuipers H., Soullie T., Hammad H., Willart M., Kool M., Hijdra D., Hoogsteden H. C., Lambrecht B. N. (2009): **Sensitization by intratracheally injected dendritic cells is independent of antigen presentation by host antigen-presenting cells.** Journal of leukocyte biology. 85(1):64–70.

Kuwana T., Mackey M. R., Perkins G., Ellisman M. H., Latterich M., Schneider R., Green D. R., Newmeyer D. D. (2002): **Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane.** Cell. 111(3):331–342.

Lafferty K. J., Cooley M. A., Woolnough J., Walker K. Z. (1975): **Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture.** Science. 188(4185):259–261.

Lambrecht B. N. (2001): **The dendritic cell in allergic airway diseases: a new player to the game.** Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 31(2):206–218.

Lambrecht B. N. (2005): **Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response.** Allergy. 60(3):271–282.

Lambrecht B. N., Hammad H. (2003): **Taking our breath away: Dendritic cells in the pathogenesis of asthma.** Nature reviews. Immunology. 3(12):994–1003.

Latchman Y., Wood C. R., Chernova T., Chaudhary D., Borde M., Chernova I., Iwai Y., Long A. J., Brown J. A., Nunes R., Greenfield E. A., Bourque K., Boussiotis V. A., Carter L. L., Carreno B. M., Malenkovich N., Nishimura H., Okazaki T., Honjo T., Sharpe A. H., Freeman G. J. (2001): **PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation.** Nature immunology. 2(3):261–268.

Leckie M. J., Brinke A. ten, Khan J., Diamant Z., O'Connor B. J., Walls C. M., Mathur A. K., Cowley H. C., Chung K. F., Djukanovic R., Hansel T. T., Holgate S. T., Sterk P. J., Barnes P. J. (2000): **Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response.** Lancet. 356(9248):2144–2148.

Ling E. M., Smith T., Nguyen X. D., Pridgeon C., Dallman M., Arbery J., Carr V. A., Robinson D. S. (2004): **Relation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease.** Lancet. 363(9409):608-615.

Liu W., Putnam A. L., Xu-Yu Z., Szot G. L., Lee M. R., Zhu S., Gottlieb P. A., Kapranov P., Gingeras T. R., Fazekas de St Groth B., Clayberger C., Soper D. M., Ziegler S. F., Bluestone J. A. (2006): **CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> Treg cells.** The Journal of experimental medicine. 203(7):1701–1711.

Lombardi V., Singh A. K., Akbari O. (2010): **The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma.** International archives of allergy and immunology. 151(3):179–189.

Lommatzsch M., Julius P., Kuepper M., Garn H., Bratke K., Irmscher S., Luttmann W., Renz H., Braun A., Virchow J. C. (2006): **The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma.** The Journal of allergy and clinical immunology. 118(1):91–97.

Lord S. J., Rajotte R. V., Korbitt G. S., Bleackley R. C. (2003): **Granzyme B: A natural born killer.** Immunological reviews. 193:31–38.

Lund J., Sato A., Akira S., Medzhitov R., Iwasaki A. (2003): **Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.** The Journal of experimental medicine. 198(3):513–520.

Lund J. M., Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams N. C., Gale N. W., Iwasaki A., Flavell R. A. (2004): **Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101(15):5598–5603.

Luo Z. X., Liu E. M., Deng B., Li X., Chen K. H., Wang L. J., Huang Y., Fu Z. (2006): **Role of FoxP3 expression and Cd4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells on the pathogenesis of childhood asthma.** Chinese Journal of Pediatrics. 44(4):267-271.

Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D. (2014): **Der Experimentator: Immunologie**. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Mahnke K., Enk A. H. (2005): **Dendritic cells: Key cells for the induction of regulatory T cells?** Current topics in microbiology and immunology. 293:133–150.

Matsumoto K., Fukuyama S., Eguchi-Tsuda M., Nakano T., Matsumoto T., Matsumura M., Moriwaki A., Kan-o K., Wada Y., Yagita H., Shin T., Pardoll D. M., Patcharee R., Azuma M., Nakanishi Y., Inoue H. (2008): **B7-DC induced by IL-13 works as a feedback regulator in the effector phase of allergic asthma**. Biochemical and biophysical research communications. 365(1):170–175.

Matsumoto K., Inoue H., Nakano T., Tsuda M., Yoshiura Y., Fukuyama S., Tsushima F., Hoshino T., Aizawa H., Akiba H., Pardoll D., Hara N., Yagita H., Azuma M., Nakanishi Y. (2004): **B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism**. Journal of immunology. 172(4):2530–2541.

Matthys H., Seeger W. (2008): **Klinische Pneumologie**. Heidelberg: Springer Medizin.

Mauri C., Bosma A. (2012): **Immune regulatory function of B cells**. Annual review of immunology. 30:221–241.

McAdam A. J., Chang T. T., Lumelsky A. E., Greenfield E. A., Boussiotis V. A., Duke-Cohan J. S., Chernova T., Malenkovich N., Jabs C., Kuchroo V. K., Ling V., Collins M., Sharpe A. H., Freeman G. J. (2000): **Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells**. Journal of immunology. 165(9):5035–5040.

McWilliam A. S., Nelson D. J., Holt P. G. (1995): **The biology of airway dendritic cells**. Immunology and cell biology. 73(5):405–413.

Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Parizot C., Taflin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochoy G., Sakaguchi S. (2009): **Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor.** Immunity. 30(6):899–911.

Mizoguchi E. (2000): **Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease.** International immunology. 12(5):597–605.

Moller G. M., Overbeek S. E., van Helden-Meeuwsen C. G., van Haarst J. M., Prens E. P., Mulder P. G., Postma D. S., Hoogsteden H. C. (1996): **Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids.** Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 26(5):517–524.

Murphy K. M., Weaver C. (2018): **Janeway Immunologie.** Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Mutschler E., Geislinger G., Kroemer H. K., Menzel S., Ruth P. (2013): **Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie, klinische Pharmakologie und Toxikologie.** Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Nishimura H., Nose M., Hiai H., Minato N., Honjo T. (1999): **Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor.** Immunity. 11(2):141–151.

Powell B. R., Buist N. R., Stenzel P. (1982): **An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy.** The Journal of pediatrics. 100(5):731–737.

Pulendran B., Smith J. L., Caspary G., Brasel K., Pettit D., Maraskovsky E., Maliszewski C. R. (1999): **Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96(3):1036–1041.

Randolph D. A., Carruthers C. J., Szabo S. J., Murphy K. M., Chaplin D. D. (1999): **Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma.** Journal of immunology. 162(4):2375–2383.

Reuter P. (2004): **Springer Lexikon Medizin.** Berlin, Heidelberg: Springer.

Rink L., Kruse A., Haase H. (2015): **Immunologie für Einsteiger.** Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Rissoan M.-C., Duhon T., Bridon J.-M., Bendriss-Vermare N., Peronne C., Saint Vis B. de, Briere F., Bates E. E. M. (2002): **Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells.** Blood. 100(9):3295–3303.

Robinson D. S., Hamid Q., Ying S., Tsicopoulos A., Barkans J., Bentley A. M., Corrigan C., Durham S. R., Kay A. B. (1992): **Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma.** The New England journal of medicine. 326(5):298–304.

ROMANI N., HOLZMANN S., TRIPP C. H., KOCH F., STOITZNER P. (2003): **Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis.** Apmis. 111(7-8):725–740.

Rulifson I. C., Sperling A. I., Fields P. E., Fitch F. W., Bluestone J. A. (1997): **CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines.** Journal of immunology. 158(2):658–665.

Ryotokuji K., Nakajima T., Ishimaru K., Ozaki-Shimada A., Kihara K., Namiki Y., Otani S. (2015): **Effect of Stress-Free Therapy on immune system: Induction of Interleukin 10 expression in lymphocytes through activation of CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) regulatory B Cells.** Laser therapy. 24(3):179–188.

Sada Y., Dohi Y., Uga S., Higashi A., Kinoshita H., Kihara Y. (2016): **Non-suppressive regulatory T cell subset expansion in pulmonary arterial hypertension.** Heart and vessels. 31(8):1319–1326.

Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Hafler D. A. (2010): **FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system.** Nature reviews. Immunology. 10(7):490–500.

Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R., Yagi H., Hori S., Fehervari Z., Shimizu J., Takahashi T., Nomura T. (2006): **Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease.** Immunological reviews. 212:8–27.

Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. (2008): **Regulatory T cells and immune tolerance.** Cell. 133(5):775–787.

Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P., Schaniel C., Lenig D., Mackay C. R., Qin S., Lanzavecchia A. (1998): **Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation.** European Journal of Immunology. 28(9):2760–2769.

Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., Zaunders J., Sasson S., Landay A., Solomon M., Selby W., Alexander S. I., Nanan R., Kelleher A., Fazekas de St Groth B. (2006): **Expression of interleukin IL-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells.** The Journal of experimental medicine. 203(7):1693–1700.

Sertl K. (1986): **Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura.** Journal of Experimental Medicine. 163(2):436–451.

Seth S., Oberdorfer L., Hyde R., Hoff K., Thies V., Worbs T., Schmitz S., Forster R. (2011): **CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions.** Journal of immunology. 186(6):3364–3372.

Sharpe A. H., Freeman G. J. (2002): **The B7-CD28 superfamily.** Nature reviews. Immunology. 2(2):116–126.



Shinoda K., Hirahara K., Nakayama T. (2017): **Maintenance of pathogenic Th2 cells in allergic disorders.** Allergology international: Official journal of the Japanese Society of Allergology. 66(3):369-376.

Shirakawa T., Enomoto T., Shimazu S., Hopkin J. M. (1997): **The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder.** Science. 275(5296):77–79.

Singh A. M., Dahlberg P., Burmeister K., Evans M. D., Gangnon R., Roberg K. A., Tisler C., Dasilva D., Pappas T., Salazar L., Lemanske R. F., JR, Gern J. E., Seroogy C. M. (2013): **Inhaled corticosteroid use is associated with increased circulating T regulatory cells in children with asthma.** Clinical and molecular allergy. 11(1):1.

Spears M., McSharry C., Donnelly I., Jolly L., Brannigan M., Thomson J., Lafferty J., Chaudhuri R., Shepherd M., Cameron E., Thomson N. C. (2011): **Peripheral blood dendritic cell subtypes are significantly elevated in subjects with asthma.** Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 41(5):665–672.

Starr T. K., Jameson S. C., Hogquist K. A. (2003): **Positive and negative selection of T cells.** Annual review of immunology. 21:139–176.

Steinke J. W., Borish L. (2001): **Th2 cytokines and asthma – Interleukin-4: Its role in the pathogenesis of asthma and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists.** Respiratory Research. 2(2):66.

Stephen-Victor E., Bosschem I., Haesebrouck F., Bayry J. (2017): **The Yin and Yang of regulatory T cells in infectious diseases and avenues to target them.** Cellular microbiology. 19(6).

Stock P., DeKruyff R. H., Umetsu D. T. (2006): **Inhibition of the allergic response by regulatory T cells.** Current opinion in allergy and clinical immunology. 6(1):12–16.

Stock S., Redaelli M., Luengen M., Wendland G., Civello D., Lauterbach K. W. (2005): **Asthma: Prevalence and cost of illness.** European Respiratory Journal. 25(1):47–53.

Takeuchi Y., Nishikawa H. (2016): **Roles of regulatory T cells in cancer immunity.** International immunology. 28(8):401–409.

Tesciuba A. G., Shilling R. A., Agarwal M. D., Bandukwala H. S., Clay B. S., Moore T. V., Weinstock J. V., Welcher A. A., Sperling A. I. (2008): **ICOS costimulation expands Th2 immunity by augmenting migration of lymphocytes to draining lymph nodes.** Journal of immunology. 181(2):1019–1024.

Tesciuba A. G., Subudhi S., Rother R. P., Faas S. J., Frantz A. M., Elliot D., Weinstock J., Matis L. A., Bluestone J. A., Sperling A. I. (2001): **Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease.** Journal of immunology. 167(4):1996–2003.

Tran D. Q., Ramsey H., Shevach E. M. (2007): **Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype.** Blood. 110(8):2983–2990.

Ueno H., Klechevsky E., Morita R., Aspod C., Cao T., Matsui T., Di Pucchio T., Connolly J., Fay J. W., Pascual V., Palucka A. K., Banchereau J. (2007): **Dendritic cell subsets in health and disease.** Immunological reviews. 219:118–142.

Ukena D., Fishman L., Niebling W.-B. (2008): **Bronchial asthma: Diagnosis and long-term treatment in adults.** Deutsches Arzteblatt international. 105(21):385–394.

Upham J. W., Denburg J. A., O'Byrne P. M. (2002): **Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects.** Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 32(6):818–823.

Upham J. W., Xi Y. (2016): **Dendritic cells in human lung disease: Recent advances.** Chest. 151(3):668–673.

Van der Vlugt L. E. P. M., Mlejnek E., Ozir-Fazalalikhani A., Janssen Bonas M., Dijkman T. R., Labuda L. A., Schot R., Guigas B., Moller G. M., Hiemstra P. S., Yazdanbakhsh M., Smits H. H. (2014): **CD24(hi) CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide.** *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 44(4):517–528.

Van Rijt L. S., Jung S., Kleinjan A., Vos N., Willart M., Duez C., Hoogsteden H. C., Lambrecht B. N. (2005): **In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma.** *The Journal of experimental medicine*. 201(6):981–991.

Vatrella A., Fabozzi I., Calabrese C., Maselli R., Pelaia G. (2014): **Dupilumab: A novel treatment for asthma.** *Journal of asthma and allergy*. 7:123–130.

Vieira P. L., Jong E. C. de, Wierenga E. A., Kapsenberg M. L., Kalinski P. (2000): **Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction.** *Journal of immunology*. 164(9):4507–4512.

Virchow J. C. (1996): **Asthma bronchiale: Extrinsisch, intrinsisch oder gemischtförmig? (Bronchial asthma: Extrinsic, intrinsic or mixed?).** *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 146(15):415–418.

Voo K. S., Wang Y.-H., Santori F. R., Boggiano C., Wang Y.-H., Arima K., Bover L., Hanabuchi S., Khalili J., Marinova E., Zheng B., Littman D. R., Liu Y.-J. (2009): **Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(12):4793–4798.

Wang J., Ioan-Facsinay A., Van der Voort E. I. H., Huizinga T. W. J., Toes R. E. M. (2007): **Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells.** *European journal of immunology*. 37(1):129–138.

Wenzel S., Castro M., Corren J., Maspero J., Wang L., Zhang B., Pirozzi G., Sutherland E. R., Evans R. R., Joish V. N., Eckert L., Graham N. M. H., Stahl N., Yancopoulos G. D., Louis-Tisserand M., Teper A. (2016): **Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting  $\beta$ 2 agonist: A randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial.** The Lancet. 388(10039):31–44.

Williams L. M., Rudensky A. Y. (2007): **Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3.** Nature immunology. 8(3):277–284.

World Health Organization (2013): **Asthma-Fact sheet N° 307.**

Wright A. K. A., Mistry V., Richardson M., Shelley M., Thornton T., Terry S., Barker B., Bafadhel M., Brightling C. (2015): **Toll-like receptor 9 dependent interferon-alpha release is impaired in severe asthma but is not associated with exacerbation frequency.** Immunobiology. 220(7):859–864.

Yang Y., Zhang H.-L., Wu J. (2010): **Role of T regulatory cells in the pathogenesis of asthma.** Chest. 138(5):1282-3.

Ying S., Humbert M., Barkans J., Corrigan C. J., Pfister R., Menz G., Larche M., Robinson D. S., Durham S. R., Kay A. B. (1997): **Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics.** Journal of immunology. 158(7):3539–3544.

Zhang B., Zhang X., Tang F. L., Zhu L. P., Liu Y., Lipsky P. E. (2008): **Clinical significance of increased CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus.** Annals of the Rheumatic Diseases. 67(7):1037–1040.

Zhao Y., Yang J., Gao Y.-D. (2011): **Altered expressions of helper T cell (Th)1, Th2, and Th17 cytokines in CD8(+) and  $\gamma\delta$  T cells in patients with allergic asthma.** The Journal of asthma: Official journal of the Association for the Care of Asthma. 48(5):429–436.

**7 Anhang****7.1 Abkürzungsverzeichnis**

A	Probanden mit Asthma
Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle
aTreg	Activated regulatory T cell
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
Breg	Regulatorische B-Zelle
Bzw.	Beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DC	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FEV <sub>1</sub>	Forcierte expiratorische Einsekundenkapazität
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward scatter
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	Human leukocyte antigene
HPE-Puffer	High performance ELISA-Puffer
HRP	Horseradish peroxidase
ICOS	Inducible T cell costimulator
ICOS-L	Inducible costimulator ligand
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTreg	Induced regulatory T cell
IQA	Interquartilsabstand

KCL	Kaliumchlorid
Lin	Lineage
m	Männlich
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
non-Treg	Non-suppressive regulatory T cell
nTreg	Naturally occurring regulatory T cell
NP	Normalperson
OAH	Orales Antihistaminikum
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PD-L2	Programmed death-ligand 2
PE	Phycoerythrin
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PerCP	Perinidin-Chlorophyll-A Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rTreg	Resting regulatory T cell
SABA	Kurzwirksamer Beta-2-Agonist
SSC	Sideward scatter
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming growth factor
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle; regulatory T cell
v/v	Volumen/Volumen-Prozent
w	Weiblich
w/v	Gewicht/Volumen-Prozent
WHO	World Health Organisation

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Querschnitt durch einen gesunden und einen asthmatischen Bronchus.....	1
Abb. 1-2:	Schematische Darstellung der T-Zell-Kostimulation .....	9
Abb. 2-1:	Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation.....	20
Abb. 2-2:	Neubauer Zählkammer.....	22
Abb. 2-3:	Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips.....	32
Abb. 2-4:	Besipiel eines typischen Boxplot-Diagramms.....	34
Abb. 3-1:	Gating-Strategie zur Identifikation von Leukozyten, B-Zellen und T-Helferzellen aus dem Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	36
Abb. 3-2:	Gating-Strategie zur Identifikation der mDCs und pDCs aus dem Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	37
Abb. 3-3:	Gating-Strategie zur Identifikation regulatorischer B-Zellen aus dem Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	38
Abb. 3-4:	Regulatorische B-Zellen im peripheren Vollblut.....	38
Abb. 3-5:	Gating-Strategie zur Identifikation von Tregs aus dem Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	39
Abb. 3-6:	Gating-Strategie zur Identifikation von rTregs, aTregs und non-Tregs aus isolierten PBMCs von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	40
Abb. 3-7:	Regulatorische T-Zellen im peripheren Vollblut.....	41
Abb. 3-8:	Gating-Strategie zur Beurteilung der Zytokinexpression in T-Helferzellen von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	43
Abb. 3-9:	Zytokinexpression in T-Helferzellen.....	44
Abb. 3-10:	Zytokinexpression in CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen.....	45
Abb. 3-11:	Exemplarische Darstellung von Histogrammen zur Beurteilung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf mDCs von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	46
Abb. 3-12:	Expression von CD86, ICOS-L und PD-L1 auf mDCs.....	47
Abb. 3-13:	Exemplarische Darstellung von Histogrammen zur Beurteilung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und intrazellulärer Moleküle auf bzw. in pDCs von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	48
Abb. 3-14:	Expression von CD86, ICOS-L, PD-L1 und Granzym B auf bzw. in pDCs.....	49
Abb. 3-15:	Lösliches PD-L2 und PD-1 im Serum.....	50
Abb. 3-16:	Korrelation zwischen der absoluten Anzahl regulatorischer B-Zellen und der prozentualen IL-4- bzw. IL-5-Expression der T-Helferzellen im peripheren Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	51



Abb. 3-17:	Korrelation zwischen der absoluten Anzahl regulatorischer B-Zellen im peripheren Vollblut und der FEV <sub>1</sub> (L) bzw. der FEV <sub>1</sub> (% vom Soll) bei Probanden mit Asthma.....	52
Abb. 3-18:	Korrelation zwischen der PD-L1-Expression auf mDCs bzw. pDCs und dem prozentualen Anteil der aTregs an allen T-Helferzellen im peripheren Vollblut von Normalpersonen und Probanden mit Asthma.....	53
Abb. 4-1:	Schematische Darstellung des indirekten Einflusses regulatorischer B-Zellen auf die FEV <sub>1</sub> von Probanden mit Asthma.....	58

**7.3 Tabellenverzeichnis**

Tab. 2-1:	Patientencharakteristika.....	16
Tab. 2-2:	Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrischen Messungen.....	24
Tab. 2-3:	Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome und die für deren Anregung benutzte Wellenlänge des Laserlichts.....	26
Tab. 2-4:	Ansätze für die FACS-Markierung von Oberflächenantigenen auf Vollblutleukozyten.....	27
Tab. 2-5:	Ansätze für die FACS-Markierung von intrazellulären Antigenen in Vollblutleukozyten.....	28
Tab. 2-6:	Ansätze für die FACS-Markierung von intrazellulären Antigenen in isolierten PBMCs.....	29
Tab. 2-7:	Ansätze für die FACS-Markierung von intrazellulären Antigenen in isolierten PBMCs nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.....	30
Tab. 3-1:	Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen im peripheren Vollblut .....	37

#### **7.4 Curriculum vitae**

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

## **7.5 Danksagung**

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

## **7.6 Persönliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst habe. Ich habe keine Hilfsmittel außer den genannten verwendet.

Claudius Matt

Rostock, am 19.02.2020

## 8 Thesen zur Dissertation

1. Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch bronchiale Hyperreagibilität und variable Atemwegsobstruktion. Unterschiedliche Zelltypen und Moleküle sind an immunregulatorischen Mechanismen, deren Dysfunktion zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Asthma bronchiale führt, beteiligt.
2. Bei Patienten mit Asthma ist, im Vergleich zu Gesunden, ein erhöhter Anteil der T-Helferzellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen differenziert. Dadurch entsteht eine Verschiebung des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Zytokinegleichgewichts zugunsten der T<sub>H</sub>2-Zytokine. Dieses Ungleichgewicht der Zytokinexpression ist an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung beteiligt.
3. CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> regulatorische B-Zellen tragen möglicherweise über die negative Regulation der T<sub>H</sub>2-Zytokinexpression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit Asthma zu einer Reduktion der asthmatischen Entzündungsreaktion bei, was wiederum zu einer Verbesserung der Lungenfunktion führt.
4. Die immunologischen Effekte, die man den CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs zuschreibt werden teilweise von den Effektorsubtypen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausgeübt.
5. Ein Ungleichgewicht zwischen den proinflammatorischen non-Tregs einerseits und den immunsuppressiven rTregs und aTregs andererseits könnte eine Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale spielen.
6. Die Anzahl von mDCs und pDCs im peripheren Blut von Patienten mit Asthma variiert und hängt maßgeblich von einer Exposition gegenüber Allergenen ab. Für gewöhnlich migrieren DCs nach Allergenexposition vermehrt aus dem peripheren Blut in das Lungengewebe.
7. pDCs sind durch die Sekretion von Granzym B in der Lage, die T-Zellproliferation zu hemmen und somit eine immunsuppressive Wirkung zu entfalten. Die Expressionsintensität von Granzym B durch pDCs aus dem peripheren Blut von Patienten mit Asthma und Gesunden ist ähnlich.

8. Die T-Zell-kostimulatorischen bzw. -koinhibitorischen Liganden CD86, ICOS-L und PD-L1 sind an immunregulatorischen Prozessen beteiligt, die in der Pathogenese des Asthma bronchiale eine Rolle spielen. Sie werden von einem ähnlichen Anteil der mDCs und pDCs von Probanden mit Asthma bzw. einer gesunden Kontrollgruppe exprimiert.
9. Bei Patienten mit Asthma fördert möglicherweise die PD-L1-Expression durch mDCs und pDCs die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aTregs.